

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-160480

(43)Date of publication of application : 23.06.1989

(51)Int.Cl.

C12N 5/00

A01N 63/00

A01N 63/02

(21)Application number : 63-292241

(71)Applicant : CIBA GEIGY AG

(22)Date of filing : 18.11.1988

(72)Inventor : RICE DOUGLAS
CAROZZI NADINE
LOTSTEIN RICHARD
DE FRAMOND ANNICK
ANDERSON DAVID M
RAJASEKARAN KANNIAH
RANGAN THIRUMALE S
YENOFKY RICHARD

(30)Priority

Priority number : 87 122109 Priority date : 18.11.1987 Priority country : US

(54) COTTON PLANT CELL INCLUDING CHIMERA GENE EXPRESSING INSECTICIDAL POLYPEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a novel transgenic cotton plant cell in which a chimera gene expressing a polypeptide is incorporated into the plant genome, that substantially develops the insect venom of crystalline protein of *Bacillus thuringiensis*.

CONSTITUTION: Cotton plant bodies are protected from insect venom and/or insect damage by incorporate a gene that codes the crystalline protein in *Bacillus thuringiensis* or a protein substantially having the insect venom of the *Bacillus thuringiensis* crystalline protein into the protoplast of cotton and then by expressing the protein or by regenerating the fertility transgenic cotton plant bodies and cultivating these insect resistant cotton plant. The cells of cotton plant is transformed through the suspension culture on the callus growth medium or the like.

⑫ 公開特許公報(A)

平1-160480

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)6月23日

C 12 N 5/00
A 01 N 63/00
63/02C-8515-4B
C-7057-4H
E-7057-4H審査請求 未請求 請求項の数 57 (全70頁)

⑭ 発明の名称 殺虫性ポリペプチドを発現するキメラ遺伝子を含むワタ細胞

⑮ 特 願 昭63-292241

⑯ 出 願 昭63(1988)11月18日

優先権主張 ⑰ 1987年11月18日 ⑱ 米国(US) ⑲ 122109

⑳ 発 明 者 ダグラス ライス アメリカ合衆国、ノースカロライナ 27705、ダーラム、
バインクレスト ロード 137㉑ 発 明 者 ナデイン、カロツチ アメリカ合衆国、ノースカロライナ 27612、ラレイ、ボ
ックス 348ビー、ルート 6㉒ 発 明 者 リチャード ロツトス アメリカ合衆国、ノースカロライナ 27705、ダーラム、
タイン デラウエア ストリート 1619㉓ 出 願 人 チバーガイギーアクチ スイス国 バーゼル市 クリベツクストラーセ 141
エンゲゼルシャフト㉔ 代 理 人 弁理士 専 優 美 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

殺虫性ポリペプチドを発現するキメラ遺伝子
を含むワタ細胞

2. 特許請求の範囲

(1) バチルス スリングエンシス結晶タンパク
質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチド
を発現するキメラ遺伝子を含むワタ細胞。(2) 植物細胞がゴッシビウム ヒルスタム、ゴ
ッシビウム アルボレウムまたはゴッシビウ
ム パルパデンスの細胞である請求項1記載
の細胞。(3) 植物細胞がゴッシビウム ヒルスタムの細
胞である請求項2記載の細胞。(4) 植物細胞が変種 Acala SJ-2, Acala GC
510, Acala B-1644 または Siokra のもの
である請求項1記載の細胞。(5) キメラ遺伝子のプロモーター、5'非翻訳領
域、および場合によっては3'非翻訳領域が、
植物体または植物ウイルス遺伝子から誘導さ

れる請求項1記載の細胞。

(6) キメラ遺伝子のプロモーター、5'非翻訳領
域および/または場合によっては3'非翻訳領
域が、リブローヌ-1, 5-ビスホスフェート
カルボキシラーゼまたはクロロフィル a/b-
結合タンパク質の小さいサブユニットをコード
する植物遺伝子から誘導される請求項5記
載の細胞。(7) プロモーター、5'非翻訳領域および/また
は場合によっては3'非翻訳領域が植物 DNA
ウイルスの遺伝子から誘導される請求項5記
載の細胞。(8) 植物ウイルスがカリフラワーモザイクウイ
ルスである請求項7記載の細胞。(9) カリフラワーモザイクウイルスプロモータ
ーが遺伝子 VI の 55S プロモーターである請求
項8記載の細胞。(10) キメラ遺伝子のプロモーター、5'非翻訳領
域および場合によっては3'非翻訳領域が、ア
グロバクテリウムプラスミドに存在し、そし

- て植物体において発現を起こすDNA配列から誘導される請求項1記載の細胞。
- (11) プロモーターがアグロバクテリウム チュメファシエンスのTiプラスミドから誘導される請求項10記載の細胞。
- (12) DNA配列がオクトピンシンターゼをコードする遺伝子から誘導される請求項10記載の細胞。
- (13) DNA配列がノバリンシンターゼをコードする遺伝子から誘導される請求項10記載の細胞。
- (14) ポリペプチドが約130,000ないし約140,000のMrを有するか、またはその殺虫性断片を有する請求項1記載の細胞。
- (15) ポリペプチドが他の分子に融合されている請求項14記載の細胞。
- (16) キメラ遺伝子がバチルス スリンギエンシス内の結晶タンパク質δ-エンドトキシンをコードするヌクレオチド配列に実質的に一致する請求項1記載の細胞。
- (17) キメラ遺伝子がバチルス スリンギエンシス内の結晶タンパク質δ-エンドトキシンをコードする遺伝子のコード領域に対してハイブリッド形成できる請求項1記載の細胞。
- (18) ポリペプチドがバチルス スリンギエンシスからの結晶タンパク質と同一な免疫学的特性を実質的に有する請求項14記載の細胞。
- (19) バチルス スリンギエンシスが、バチルス スリンギエンシス クルスタキ変種、バチルス スリンギエンシス ベルリナー変種、バチルス スリンギエンシス アレスチ変種、バチルス スリンギエンシス トルウオルチ変種、バチルス スリンギエンシス ソットー変種、バチルス スリンギエンシス デンドロリマス変種、バチルス スリンギエンシス テネブリオニス変種、バチルス スリンギエンシス サンジェゴ変種およびバチルス スリンギエンシス アイザワイ変種からなる群から選択される亜種である請求項16、17または18記載の細胞。
- (20) バチルス スリンギエンシスがそのクルスタキ変種HD1である請求項19記載の細胞。
- (21) 遺伝子が下記のアミノ酸配列：

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10
Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30
Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50
Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70
Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90
Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110
Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130
Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150
Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser	170
Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln	180
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn	190
Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile	200
Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp	210
Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly	220
Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn	230
Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	240
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr	250
Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val	260
Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn	270
Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe	280
Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser	290
Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu	300
Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His	310
Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	320
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly	330
Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Thr	340
Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile	350
Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg	360
Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro	370
Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu	380
Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr	390
Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	400
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu	410
Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val	420
Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu	430
Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe	440
Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala	450
Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala	460
Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln	470
Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr	480
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys	490

Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu	500
Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr	510
Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser	520
Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala	530
Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser	540
Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn	550
Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn	560
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly	570
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly	580
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val	590
Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp	600
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr	610
Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala	620
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser	630
Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val	640
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn	650
Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys	660
Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys	670
Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu	680
Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg	690
Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp	700
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly	710
Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	720
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr	730
Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu	740
Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln	750
Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp	760
Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala	770
Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr	780
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser	790
Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His	800
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys	810
Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp	820
Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly	830
His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu	840
Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu	850
Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp	860
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	870
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu	880
Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln	890
Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile	900
Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val	910
His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu	920
Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala	930
Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe	940
Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	950
Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly	960
Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val	970
Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser	980
Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu	990
Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly	1000
Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr	1010
Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr	1020
Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	1030
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu	1040
Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn	1050

Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	1060
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr	1070
Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val	1080
Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	1090
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn	1100
Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp	1110
Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr	1120
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp	1130
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu	1140
Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu	1150
Leu Leu Met Glu Glu End	1156

を有するポリペプチドを発現する請求項20

記載の細胞。

(22) 遺伝子のコード領域が下記のDNA配列：

10	20	30	40	50	60
GTTAACACCC	TGGGTCAAAA	ATTGATATTT	AGTAAAAATTA	GTTGCACTTT	GIGCATTTTT
70	80	90	100	110	120
TCATAAGATG	AGTCATATGT	TTTAAATTGT	AGTAATGAAA	AACAGTATTA	TATCATAATG
130	140	150	160	170	180
AATTGGTATC	TTAATAAAAG	AGATGGAGGT	AAC TTATGGA	TAACAATCCG	AACATCAATG
190	200	210	220	230	240
AATGCATTCC	TTATAATTGT	TTAAGTAACC	CTGAAGTAGA	AGTATTAGGT	GGACAAAGAA
250	260	270	280	290	300
TAGAAACTGG	TTACACCCCA	ATCGATATTT	CCTTGTCGCT	AACGCAATTT	CTTTTGAGTG
310	320	330	340	350	360
AATTTGTTCC	CGGTGCTGGA	TTTGTGTTAG	GA CTAGTTGA	TATAATATGG	GGAATTTTTG
370	380	390	400	410	420
GTCCCTCTCA	ATGGGACGCA	TTTCTGTGAC	AAATTGAACA	GTTAATTAAC	CAAAGAATAG
430	440	450	460	470	480
AAGAATTTCG	TAGGAACCAA	GCCATTTCTA	GATTAGAAGG	ACTAAGCAAT	CTTTATCAAA
490	500	510	520	530	540
TTTACGCAGA	ATCTTTTAGA	GAGTGGGAAG	CAGATCCTAC	TAATCCAGCA	TTAAGAGAAG
550	560	570	580	590	600
AGATGCGTAT	TCAATTCAAT	GACATGAACA	GTGCCCTTAC	AACCGCTATT	CCTCTTTTTG
610	620	630	640	650	660
CAGTTCAAAA	TTATCAAGTT	CCTCTTTTAT	CAGTATATGT	TCAAGCTGCA	AATTTACATT
670	680	690	700	710	720
TATCAGTTTT	GAGAGATGTT	TCAGTGTTTG	GACAAAGGTG	GGGATTGTAT	GCCGCGACTA
730	740	750	760	770	780
TCAATAGTCG	TTATAATGAT	TTAACTAGGC	TTATTGGCAA	CTATACAGAT	CATGCTGTAC
790	800	810	820	830	840
GCTGGTACAA	TACGGGATTA	GAGCGTGTAT	GGGGACCGGA	TTCTAGAGAT	TGGATAAGAT
850	860	870	880	890	900
ATAATCAATT	TAGAAGAGAA	TTAACACTAA	CTGTATTAGA	TATCGTITCT	CTATTTCCGA
910	920	930	940	950	960
ACTATGATAG	TAGAACGTAT	CCAATTCGAA	CAGTTTCCCA	ATTAACAAGA	GAAATTTATA
970	980	990	1000	1010	1020
CAAACCCAGT	ATTAGAAAAT	TTTGATGGTA	GTTTTGAGG	CTCGGCTCAG	GGCATAGAAG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GAAGTATTAG	GAGTCCACAT	TTGATGGATA	TACTTAACAG	TATAACCATC	TATACGGATG

1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTCATAGAGG	AGAATATTAT	TGGTCAGGGC	ATCAAATAAT	GGCTTCTCCT	GTAGGGTTTT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CGGGGCCAGA	ATTCACTTTT	CCGCTATATG	GAACATATGG	AAATGCAGCT	CCACAACAAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTATTGTTGC	TCAACTAGGT	CAGGGCGTGT	ATAGAACATT	ATCGTCCACT	TTATATAGAA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GACCTTTTAA	TATAGGGATA	AATAATCAAC	AACTATCTGT	TCTTGACGGG	ACAGAAATTTG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CTTATGGAAC	CTCCTCAAAT	TTGCCATCCG	CTGTATACAG	AAAAAGCGGA	ACGGTAGATT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CGCTGGATGA	AATACCGCCA	CAGAATAACA	ACGTGCCACC	TAGGCAAGGA	TTTAGTCATC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GATTAAAGCCA	TGTTTCAATG	TTTCGTTTCA	GCITTAGTAA	TAGTAGTGTA	AGTATAATAA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GAGCTCCTAT	GTTCTCTTGG	ATACATCGTA	GTGCTGAATT	TAATAATATA	ATTCTTCAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CACAAATTAC	ACAAATACCT	TTAACAAAAT	CTACTAATCT	TGGCTCTGGA	ACTTCTGTGC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
TTAAAGGACC	AGGATTTTACA	GGAGGAGATA	TTCTTCGAAG	AACITTCACCT	GGCCAGATTT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CAACCTTAAAG	AGTAAATATT	ACTGCACCAT	TATCACAAAG	ATATCGGGTA	AGAATTCGCT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACGCTTCTAC	CACAAATTTA	CAATTCCATA	CATCAATTGA	CGGAAGACCT	ATTAATCAGG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GGAATTTTTC	AGCAACTATG	AGTAGTGGGA	GTAATTTTACA	GTCCGGAAGC	TTTAGGACTG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TAGGTTTTAC	TACTCCGTTT	AACTTTTCAA	ATGGATCAAG	TGTATTTTACG	TTAAGTGCTC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ATGCTTTCAA	TTCAGGCAAT	GAAGTTTATA	TAGATCGAAT	TGAATTTGTT	CCGGCAGAAG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TAACCTTTGA	GGCAGAATAT	GATTTAGAAA	GAGCACAAAA	GGCGGTGAAT	GAGCTGTTTA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CTTCTTCCAA	TCAAATCGGG	TTAAAAACAG	ATGIGACGGA	TTATCATATT	GATCAAGTAT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CCAATTTAGT	TGAGTGTTTA	TCTGATGAAT	TTTGTCTGGA	TGAAAAAAA	GAATTGTCCG

2170	2180	2190	2200	2210	2220
AGAAAGTCAA	ACATGCGAAG	CGACTTAGTG	ATGAGCGGAA	TTTACTTCAA	GATCCAAACT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TTAGAGGGAT	CAATAGACAA	CTAGACCGTG	GCTGGAGAGG	AAGTACGGAT	ATTACCATCC
2290	2300	2310	2320	2330	2340
AAGGAGGCCA	TGACGTATTC	AAAGAGAATT	ACGTTACGCT	ATTGGGTACC	TTTGATGAGT
2350	2360	2370	2380	2390	2400
GCTATCCAAC	GTATTATAT	CAAAAAATAG	ATGAGTCGAA	ATTAAAAGCC	TATACCCGTT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
ACCAATTAAG	AGGGTATATC	GAAGATACTC	AAGACTTAGA	AATCTATTTA	ATTGCTIACA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
ATGCCAAACA	CGAAACAGTA	AATGTGCCAG	GTACGGGTTC	CTTATGCCCC	CTTTCAGCCC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CAAGTCCAAT	CGGAAAATGT	GCCCATCATT	CCCATCATTT	CTCCTTGAC	ATTGAIGTTG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GATGTACAGA	CTTAAATGAG	GACTTAGGTG	TATGGGTGAT	ATTCAAGATT	AAGACGCAAG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
ATGGCCATGC	AAGACTAGGA	AATCTAGAAT	TTCTCGAAGA	GAAACCATT	GTAGGAGAAG
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CACTAGCTCG	TGTGAAAAGA	GCGGAGAAAA	AATGGAGAGA	CAAACGTGAA	AAATTGGAAT
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GGGAAACAAA	TATTGTTTAT	AAAGAGGCAA	AAGAATCTGT	AGATGCTTTA	TTTGTAAGT
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CTCAATATGA	TAGATTACAA	GCGGATACCA	ACATCGCGAT	GATTTCATGCG	GCAGATAAAC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GCGTTCATAG	CATTGAGAAA	GCTTATCTGC	CTGAGCTGTC	TGTGATTCCG	GGTGTCAATG
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CGGCTATTTT	TGAAGAATTA	GAAGGGCGTA	TTTTACTGTC	ATTCTCCCTA	TATGATGCGA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GAAATGTCAT	TAAAAATGGT	GATTTTAATA	ATGGCTTATC	CTGCTGGAAC	GTGAAAGGGC
3070	3080	3090	3100	3110	3120
ATGTAGATGT	AGAAGAACAA	AACAACCACC	GTTCCGGTCT	TGTTGTTCCG	GAATGGGAAG
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CAGAAGTGTC	ACAAGAAGTT	CGTGTCTGTC	CGGGTCGTGG	CTATATCCTT	CGTGTACACG
3190	3200	3210	3220	3230	3240
CGTACAAGGA	GGGATATGGA	GAAGGTTGCG	TAACCATTCA	TGAGATCGAG	AACAATACAG
3250	3260	3270	3280	3290	3300
ACGAACTGAA	GTTTAGCAAC	TGTGTAGAAG	AGGAAGTATA	TCCAAACAAC	ACGGTAACGT

3310	3320	3330	3340	3350	3360
GTAATGATTA	TACTGCGACT	CAAGAAGAAT	ATGAGGGTAC	GTACACTTCT	CGTAATCGAG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GATATGACGG	AGCCTATGAA	AGCAATTCTT	CTGTACCAGC	TGATTATGCA	TCAGCCTATG
3430	3440	3450	3460	3470	3480
AAGAAAAAGC	ATATACAGAT	GGACGAAGAG	ACAATCCTTG	TGAATCTAAC	AGAGGATATG
3490	3500	3510	3520	3530	3540
GGGATTACAC	ACCACTACCA	GCTGGCTATG	TGACAAAAGA	ATTAGAGTAC	TTCCCAGAAA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
CCGATAAGGT	ATGGATTGAG	ATCGGAGAAA	CGGAAGGAAC	ATTTCATCGTG	GACAGCGTGG
3610	3620	3630	3640	3650	3660
AATTACTTCT	TATGGAGGAA	TAATATATGC	TTTATAATGT	AAGGTGTGCA	AATAAAGAAT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
GATTACTGAC	TTGTATTGAC	AGATAAATAA	GGAAATTTTT	ATATGAATAA	AAAACGGGCA
3730	3740	3750	3760	3770	3780
TCACTCTTAA	AAGAATGATG	TCCGTTTTTT	GTATGATTTA	ACGAGTGATA	TTTAAATGTT
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TTTTTTGCGA	AGGCTTTACT	TAACGGGGTA	CCGCCACATG	CCCATCAACT	TAAGAATTGG
3850	3860	3870	3880	3890	3900
CACTACCCCC	AAGTGTCAAA	AAACGTTATT	CTTCTAAAA	AGCTAGCTAG	AAAGGATGAC
3910	3920	3930	3940	3950	3960
ATTTTTTATG	AATCTTTCAA	TTCAAGATGA	ATTACAATA	TTTTCTGAAG	AGCTGTATCG
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TCATTTAACC	CCTTCTCTTT	TGGAAGAACT	CGCTAAAGAA	TTAGGTTTTG	TAAAAAGAAA
4030	4040	4050	4060	4070	4080
ACGAAAGTTT	TCAGGAAATG	AATTAGCTAC	CATATGTATC	TGGGGCACTC	AACGTACAGC
4090	4100	4110	4120	4130	4140
GAGTGATTCT	CTCGTTCGAC	TATGCAGTCA	ATTACACGCC	GCCACAGCAC	TCTTATGAGT
4150	4160	4170	4180	4190	4200
CCAGAAGGAC	TCAATAAACG	CTTTGATAAA	AAAGCGGTTG	AATTTTTGAA	ATATATTTTT
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TCTGCATTAT	GGAAAAGTAA	ACTTTGTAAA	ACATCAGCCA	TTTCAAGTGC	AGCACTCAGC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
TATTTTCAAC	GAATCCGTAT	TTTAGATGCG	ACGATTTTCC	AAGTACCGAA	ACATTAGCA
4330	4340	4350	4360		
CATGTATATC	CTGGGTCAGG	TGGTTGTGCA	CAAACCTGCAG		

- からなる請求項1記載の細胞。
- (23) キメラ遺伝子が請求項21記載のアミノ酸配列に実質的に相同な配列を有する殺虫性ポリペプチドを発現する請求項20記載の細胞。
- (24) キメラ遺伝子が請求項22記載のDNA配列に実質的に相同な配列を示す請求項20記載の細胞。
- (25) 請求項1ないし24のいずれか1項に記載のワタ細胞の培養体。
- (26) ワタ細胞がゴッシビウム ヒルスタム、ゴッシビウム アルボレウムおよびゴッシビウム パルパデンスの細胞である請求項25記載の培養体。
- (27) ワタ細胞がゴッシビウム ヒルスタムの細胞である請求項26記載の培養体。
- (28) 細胞がプロトプラストである請求項25ないし27のいずれか1項に記載の培養体。
- (29) パチルス スリンギエンシス結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドを発現する遺伝子を含むワタ植物体。
- (30) パチルス スリンギエンシス結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドを発現する遺伝子を、植物体を昆虫の幼虫に忌避させる、および/または植物体を昆虫の幼虫に対して毒性にするために十分な量で含む請求項29記載のワタ植物体。
- (31) パチルス スリンギエンシス結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドを発現する遺伝子を、綱翅目、双翅目および甲虫目の幼虫に対して植物体を毒性にするために十分な量で含む請求項30記載のワタ植物体。
- (32) ゴッシビウム ヒルスタム、ゴッシビウム アルボレウムおよびゴッシビウム パルパデンスからなる群から選択される請求項29記載の植物体。
- (33) 植物細胞がゴッシビウム ヒルスタムの細胞である請求項33記載の植物体。
- (34) 請求項29ないし33のいずれか1項に記載の遺伝子導入ワタ植物体のムカゴ。
- (35) 遺伝子導入ワタ植物体から得ることができるプロトプラスト、細胞、カルス、組織、胚、器官、種子、花粉、胚珠、接合子およびその他のあらゆるムカゴからなる群から選択される請求項34記載のムカゴ。
- (36) 有性的にまたは無性的に増殖させることができるか、または試験管内でまたは生体内で増殖させることができる請求項34記載のムカゴ。
- (37) 請求項29ないし33のいずれか1項に記載の遺伝子導入ワタ植物体の後代、または出発材料の特性を依然有し、外来DNAの以前の形質転換により引き起こされる突然変異体およびそれらの変種。
- (38) a) ワタ細胞に抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を付与する遺伝子を含有するアグロバクテリウムベクターとワタ移植片とを、該移植片に前記遺伝子を転移するのに十分な時間接触させ、
b) 形質転換された移植片をカルス生長培地中、移植片からカルスに生長するまで約16時間明所および8時間暗所のサイクルで、25ないし約35℃の温度で約15ないし約200時間培養し、
c) 培養された移植片を、アグロバクテリウムに有毒な抗生物質含有のカルス生長培地と、該アグロバクテリウムを殺すのに十分な時間接触させ、
d) アグロバクテリウムが存在しないカルスをカルス生長培地上で培養し、
e) 抗生物質ハイグロマイシンに対して耐性のカルスの選択を可能にするのに十分な濃度の抗生物質ハイグロマイシンと生成する胚形成性カルスとを接触させ、そして
f) 形質転換された胚形成性カルスを選択することからなる形質転換された胚形成性ワタカルスを産生する方法。
- (39) 更に、形質転換されたカルスを発芽させ、そしてそれから小植物体を生長させる工程からなる請求項38記載の方法。

(40) 工程(c)においてカルス生長培地と接触させる前に、アグロバクテリウムに対し有毒な抗生物質を含まないカルス生長培地中形質転換されたカルスをすすぐ請求項38記載の方法。

(41) ワタ実生移植片が胚軸、子葉およびそれらの混合物から選択される請求項38記載の方法。

(42) カルス生長培地が、約1ないし約10mg/lのナフタレン酢酸で補足したムラシゲおよびストック培地である請求項38記載の方法。

(43) アグロバクテリウムに対して有毒な抗生物質がセフトキシムである請求項38記載の方法。

(44) 懸濁副次培養生長周期の後に、

a) カルス生長培地から細胞および胚形成性カルスを回収し；

b) ワタ細胞に抗生物質ハイグロマイシン耐性を与える遺伝子を有するアグロバクテリウムベクターを含有するカルス生長培地中に前記細胞および胚形成性カルスを再懸濁

し、そして懸濁細胞を形質転換するのに十分な期間、懸濁液を生長条件に保ち；

c) アグロバクテリウムを含有するカルス生長培地から懸濁細胞を回収し；

d) 形質転換された細胞および胚形成性カルスをアグロバクテリウムを殺すのに十分な濃度の抗生物質で処理し；

e) 形質転換された細胞および胚形成性カルスを選択するために、細胞および胚形成性カルスを抗生物質ハイグロマイシンと接触させ；

f) 懸濁液を濾過して約600μmより大きい胚形成性カルスを除去する、ことからなるカルス生長培地上で懸濁培養を経てワタ細胞を形質転換する方法。

(45) 工程(d)および(e)を工程(f)の前に行なう請求項44記載の方法。

(46) 工程(d)および(e)を工程(f)の後に行なう請求項44記載の方法。

(47) 工程(d)を工程(f)の前に行ない、そして工程

(e)を工程(f)の後に行なう請求項44記載の方法。

(48) 工程(e)を工程(f)の前に行ない、そして工程(d)を工程(f)の後に行なう請求項44記載の方法。

(49) 工程(d)の抗生物質がセフトキシムである請求項44記載の方法。

(50) 懸濁副次培養生長周期が約7ないし約14日である請求項44記載の方法。

(51) 更に、形質転換されたワタ細胞を小植物体に生長させる工程からなる請求項44記載の方法。

(52) 抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を有する形質転換されたワタ植物体。

(53) ワタ植物体を構成する植物細胞内にバチルス スリンギエンシス結晶タンパク質またはバチルス スリンギエンシス結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質を、昆虫の幼虫を殺すかまたは防除するのに十分な量で発現させることからなる昆虫損傷に対

してワタ植物体を保護する方法。

(54) 昆虫の幼虫が鱗翅目、甲虫目または双翅目の幼虫である請求項53記載の方法。

(55) 昆虫の幼虫が、鱗翅目の幼虫である請求項54記載の方法。

(56) バチルス スリンギエンシス結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有する毒素を殺虫剤発現するカメラ遺伝子を含有するワタ植物細胞を昆虫の幼虫に授食させることにより、昆虫の幼虫を殺すかまたは防除する方法。

(57) 結晶タンパク質がバチルス スリンギエンシス クルスタキ亜種HD1のものである請求項53または56のいずれか1項に記載の方法。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、バチルス スリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*, 以後Btと略す)により産生される結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有する殺虫剤を、ワタ細胞内に発現する

キメラ遺伝子に関する。

〔従来の技術〕

Btは、 δ -エンドトキシンと記載される結晶タンパク質を産生する細菌の一種である。この結晶タンパク質は技術的には、鱗翅目 (lepidopteran)、甲虫目 (coleopteran) および双翅目 (dipteran) 昆虫の幼虫により摂取されて毒素に変換されるプロトキシンである。

Btからの結晶タンパク質は、ヒト、その他の哺乳類、鳥類、魚類または鱗翅目、甲虫目および双翅目昆虫の幼虫以外の昆虫に知られていない有害効果を有する潜在的に重要な殺虫剤である。Bt毒素の有効性は極端に高く、その結果感受性昆虫の幼虫を殺すにはナノグラム量必要だけである。殺虫剤としてBtからの結晶タンパク質を使用するその他の利点は、鱗翅目、甲虫目および双翅目昆虫の幼虫に対する有効性の広いスペクトル、および結晶タンパク質が大規模に用いられる場合でさえも、そのような幼虫が該結晶タンパク質に対して耐性を発現すること

との明らかな困難さを含む。前記幼虫は農業および林業、そして特にワタ栽培において大きな問題である。

結晶タンパク質は、鱗翅目、甲虫目または双翅目の幼虫の侵入に晒されている植物に施用される場合に殺虫剤として有効である。そのような植物は、ブロッコリー、レタスおよびワタを含む。鱗翅目の幼虫がワタ植物体において特に危険である。

これまでは、Bt結晶タンパク質 (プロトキシン) は、バチルスから分離され、そして標準法例えば散布または噴霧により植物体に施用していた。Bt結晶タンパク質を含む調剤は生物学的除草剤として市販されて使用される。

例えば、バイオケム プロダクツ (Biochem Products) 社により供給されるバクトスペイン (Bactospeine)、アボット ラボラトリーズ (Abbot Laboratories) により供給されるジベル (Dipel) およびサンド (Sandoz) 社により供給されるサーサイド (Thurcide)。

〔発明が解決しようとする課題〕

Btが胞子形成の間のみ結晶タンパク質を産生するという事実は、この生物学的殺虫剤の製造および使用との関係で重大な問題点を表わす。そのような成長段階の限定は特に工業工程において、製造に不便および過剰な所要時間をもたらす。さらに、前記の製造と結びついた費用は、そのような生物学的殺虫剤が化学物質に基づいたその他の市販されて利用できる物質、例えばピレスロイド誘導体と有効に競争することを困難にした。

Bt毒素の使用に関するその他の問題点は、例えば該タンパク質は処理された植物体の表面に通常残存するという事実であり、そこで表面摂食幼虫に対してのみ有効であり、そして紫外線輻射に感応された曝露により不活性化されることである。この不活性化は環境における結晶タンパク質の永続性の一般的な欠乏の少なくとも1つの原因であり得る。従って該結晶タンパク質の頻繁をそして高価な施用が必要である。

これらのおよびその他の問題点は、Bt結晶タンパク質またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質をコードする遺伝子を植物体に含みそして発現することにより解決され得る。Bt結晶タンパク質またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質をコードする遺伝子をワタのプロトプラスト内に含み、そして発現することにより、およびその形質転換されたプロトプラストから総性の遺伝子導入ワタ植物体を再生し、そしてこれらの昆虫耐性ワタ植物体を栽培することにより、上記問題点がどのように解決され得るかを本発明は記載している。

遺伝子工学を利用することにより、有用なポリペプチドの産生に関連する遺伝子は、該遺伝子が自然に生じている供与細胞から該遺伝子が自然には生じていない宿主細胞へ転移され得る。(米国特許第4,237,224号および同第4,468,464号)。実際にはそのような転移にはわずかの固有の制限がある。遺伝子はウイルス、細菌、植

物および動物の間を転移され得る。ある場合には、宿主細胞内で、転移された遺伝子は機能的であるか、または機能的であるようにされ得る。宿主細胞が植物細胞である場合、完全な植物体が細胞から再生され得る。

遺伝子はプロモーターおよび転写領域を含むDNA配列の領域を典型的に含む。該転写領域は5'非翻訳領域、コード配列および3'非翻訳領域を通常含む。

転写領域がmRNAに変換される間、プロモーターは転写の開始に必要なDNA配列を含む。真核細胞において、プロモーターはRNAポリメラーゼにより認識される領域および転写の開始のためにDNA上にRNAポリメラーゼを位置させる領域を含むと考えられている。後者の領域はTATAボックスと記載され、転写開始の部位から約30ヌクレオチド上流に通常生じる。

プロモーターに続いている領域はmRNAに転写される配列であるが、ポリペプチドに翻訳されない配列である。この配列はいわゆる5'非翻

訳領域(5'untranslated region)を構成し、そして翻訳の開始に関する配列例えばリボソーム結合部位を含むと考えられている。

コード領域は、DNAまたは相当するRNA内の5'非翻訳領域からわずかに下流にある配列である。それは遺伝コードに従ってポリペプチドに翻訳されるコード領域である。Btは例えば殺虫性プロトキシン結晶タンパク質のアミノ酸配列に翻訳されるコード配列を有する遺伝子を有する。

コード領域には、mRNAに転写されるがポリペプチドに転写されない配列が続く。この配列は3'非翻訳領域(3'untranslated region)と呼ばれ、そして転写の終結を導くシグナル、および真核細胞のmRNAにおいて転写されたmRNAの糸のポリアデニル化を起こすシグナルを含むと考えられている。mRNAのポリアデニル化はプロセッシングおよび移送機能を有すると考えられている。

天然の遺伝子は供与細胞から宿主細胞にそれ

らの全体が転移され得る。しかしながら、コード領域と同一な遺伝子に全く存在しないプロモーターおよび場合によっては5'および3'非翻訳領域を有する所望のコード領域を含む遺伝子を構築することはしばしば好ましい。そのような構造物はキメラ遺伝子として公知である。

遺伝子工学の方法は結晶タンパク質を産生する改良された方法を記載している。例えば、米国特許第4,448,885号および同第4,467,036号はBt以外の細菌の株内に結晶タンパク質を産生するプラスミドを記載している。これらの方法は結晶タンパク質の産生を可能とするが、しかし市販の殺虫剤として結晶タンパク質を使用する問題点を解決するものではない。

植物が植物自身を保護することを可能とするために該植物体内に直接Bt毒素遺伝子を無性生殖させるといふ示唆がなされている[クラウスナー(Klausner)1984年]。欧州特許出願EP-0,142,924号[アグリジェネティクス(Agrigenetics)]はタバコ内にBtからの毒

素遺伝子をクローニングする方法を主張しており(第59頁)、そして同様の方法でワタを保護することを示唆している(第77頁)。

しかしながら、そのような示唆は、ワタ細胞を形質転換し、そして該細胞から植物体を再生する方法が利用可能となるまでの単なる推論を構成するだけである。そのような方法は、名称が「ワタの再生と形質転換」で出願人がフィトゲン(Phytogen)の米国特許出願第122,200号、および名称が「培養細胞からワタを再生するための効果的方法」で出願人がチパーガイギーの米国特許出願第122,162号に記載されている。米国特許出願第122,200号および同第122,162号は本願の優先権主張の基礎となる先の出願と同じ日に出願された。フィトゲンの特許出願第122,200号におけるワタ細胞を形質転換するための方法並びにフィトゲンおよびチパーガイギーのそれぞれの特許出願第122,200号および第122,162号におけるワタ植物体を再生するための方法は、参照により本明細書内

に編入される。

Btの結晶タンパク質またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性(殺虫有効性)を実質的に有する同様のポリペプチドを産生する新規な方法を開発するために、および前記ワタ植物体を摂食する昆虫の幼虫を防除する新規な方法を開発するための必要性が存在する。「防除する」とは幼虫を殺すか、または少なくともそれら幼虫の摂食を減少させるかのいずれかに関するものと理解すべきである。有害生物または病原体を殺すか防除するのに十分有効な量の有害生物防除性または抗病原体性タンパク質を植物細胞および植物体にそれぞれ産生することからなる有害生物または病原体により引き起こされる損傷に対してワタ植物体を保護する方法のために他の必要性が存在する。Bt結晶タンパク質またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質の、植物を摂食する昆虫を殺すか、または防除するのに十分有効である殺虫有効量を植物細胞内に産生することからなる昆虫損傷

発現により該植物体を昆虫に忌避させるか、および/または該植物体を昆虫に対して毒性にするキメラ遺伝子をゲノム内に安定に組入れられた遺伝子導入ワタ植物体もまた本発明に含まれる。

本発明はまた、上記遺伝子導入ワタ植物体のムカゴ(propagule)および後代(progeny)にも関する。

上記遺伝子導入ワタ植物体のムカゴは有性的にまたは無性的に増殖させ得るまたは生体内でもしくは試験管内で増殖させ得るあらゆる材料を含む。この増殖する材料の中で、プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、花粉、胚珠、接合子または上記遺伝子導入ワタ植物体から得られるあらゆるその他の繁殖材料が好ましい。

本発明のその他の目的は、上記遺伝子導入ワタ植物細胞または植物体の後代を含む。

遺伝子導入ワタ植物体の後代はそれらの突然変異体および変種を含む。突然変異体および変

に対してワタ植物体を保護する方法のために他の必要性が好ましくは存在する。生態系に最小限の副作用を有するワタ植物体に化学薬剤が安全に施用され得るように、化学薬剤による例えばある種の除草剤に対して許容性を増加させることによる損傷からワタ植物体を保護する方法のためにその他の必要性が存在する。

本発明のこれらのおよびその他の目的は、以下の詳細な記載から理解され得るように、Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドをワタ細胞内に発現し得るキメラ遺伝子(以後、キメラBt毒素遺伝子)を提供することにより達成された。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は第一に、Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドをワタ細胞内に発現するキメラ遺伝子を植物ゲノム内に安定に組入れた遺伝子導入ワタ植物細胞に関する。

遺伝子導入ワタ植物細胞から再生され得、そして昆虫がワタ植物体の摂食を止めるように、

種は、例えば出発材料の特性を依然有し、外来DNAの以前の形質転換により引き起こされる細胞融合または突然変異選択から得られたそれらの植物体を含む。

それ故に、Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有する毒素を、ワタの細胞内に産生する方法を提供することが本発明の目的である。カルス生長培地上で懸濁培養を経てワタの細胞を形質転換する方法が特に好ましく、その方法は：

懸濁副次培養生長周期の後に、

- カルス生長培地から細胞および胚形成カルスを回収し；
- ワタ細胞に抗生物質ハイグロマイシン耐性を与える遺伝子を有するアグロバクテリウム(Agrobacterium)ベクターを含有するカルス生長培地中に前記細胞および胚形成性カルスを再懸濁し、そして懸濁細胞を形質転換するのに十分な期間、懸濁液を生長条件に保ち；
- アグロバクテリウムを含有するカルス生長

培地から懸濁細胞を回収し；

- d) 形質転換された細胞および胚形成性カルスをアグロバクテリウムを殺すのに十分な濃度の抗生物質で処理し；
- e) 形質転換された細胞および胚形成性カルスを選択するために、細胞および胚形成性カルスを抗生物質ハイグロマイシンと接触させ；
- f) 懸濁液を濾過して約600ミクロン(μm)より大きい胚形成性カルスを除去することからなる。

Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有する殺虫量の毒素を発現するキメラ遺伝子を含むワタ植物細胞を昆虫に摂食させることにより昆虫の幼虫を殺す方法を提供することは、本発明のその他の目的である。殺虫性ワタ植物細胞は、植物体の全体および植物体の部分並びに培養液中の個々のワタの細胞を含む。

昆虫の幼虫を殺すか、または少なくとも防除するのに十分な量で、植物体を構成する植物細胞内に、Bt結晶タンパク質またはBt結晶タ

ンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質の発現からなる昆虫損傷に対してワタ植物体を保護する方法を提供することが本発明のその他の目的である。

鱗翅目の幼虫により引き起こされる損傷に対してワタ植物体を保護する方法が特に好ましい。

結晶タンパク質またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質が、植物体を忌避させるおよび／または昆虫に対して毒性にするのに十分な量で植物細胞内に発現され、その結果昆虫が植物体を摂食することを止める方法を提供することが、本発明のその他の目的である。

上記の方法に関連した遺伝子およびその他のDNA断片並びに細胞および植物体を提供することは本発明のその他の目的である。

本発明の付加的な実施態様は、ベクター、細胞、培養体における植物細胞および生長している植物体内の植物細胞内のキメラBt毒素遺伝子、並びにワタ細胞内にBt結晶タンパク質の

昆虫毒性を実質的に有する毒素を産生する方法およびBt結晶タンパク質またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するタンパク質を防除または殺虫有効量植物細胞内に産生することからなる、昆虫損傷に対してワタ植物体を保護する方法を包含する。

寄託：

本発明に関連して、下記のプラスミドおよび／または微生物を、国際寄託機関、マリーランド、ロックヴィレのアメリカン タイプ カルチャー コレクションに、ブダペスト条約の要求に従って寄託した。

- 1) 大腸菌 MC1061, pCIB10/35SBT ————— ATCC 67329

(寄託日：1987年2月27日)

- 2) 大腸菌 HB101, pCIB10/19SBT ————— ATCC 67330

(寄託日：1987年2月27日)

- 3) プラスミド pLV111 ————— ATCC 40235

(寄託日：1987年5月14日)

- 4) ファージ λ/rbc-gY ————— ATCC 40486

(寄託日：1988年8月25日)

- 5) ファージ λ/rbc-gX ————— ATCC 40487

(寄託日：1988年8月25日)

本発明は、キメラBt毒素遺伝子の産生に関する。意図されるワタ植物細胞は、その中に外来DNAが誘導され、複製されそして発現され得るワタ植物体のいかなるものでもおよび全ての細胞を包含する。ワタ植物種のいくつかの適当な例は、ゴッソビウム ヒルスタム(*Gossypium hirsutum*)、ゴッソビウム アルボレウム(*Gossypium arboreum*)、およびゴッソビウム バルバデンス(*Gossypium barbadense*)を含む。上記の実例は、例示のためだけにここに含められたものであり、そして限定しようというものではない。ゴッソビウム ヒルスタムが好ましく、そしてストリッパー(stripper)

タイプまたはピッカー (picker) タイプのものであって良い。ストリッパーコットン (stripper cotton) とピッカーコットン (picker cotton) とは収穫の方法が異なる。ストリッパーコットンのさく果 (bolls) は季節はずれの嵐の間に解離しないように植物体にしっかりと結びついていて、ストリッパーコットンの収穫は、植物体をほとんど破壊する。ピッカーコットンはよりゆるく結びついており、そしてより破壊性の少ない方法で収穫される。本発明の方法で再生され得るゴッシビウム ヒルスタムのいくつかの市販されて利用できる変種には以下のものが含まれる：

Acala 1515-75, Acala SJ-2, Acala SJ-4, Acala SJ-5, Acala SJC-1, Acala SJC-22, Acala SJC-28, Acala SJC-30, Acala B-1644, Acala B-1810, Acala B-2724, Acala GC-510, Coker 304, Coker 315, Coker 201, Coker 310, Coker 312, DP 41, DP 90,

含む。

本発明のキメラ遺伝子はワタ植物体内で有効に機能するプロモーター領域および Bt からの結晶タンパク質または Bt からの結晶タンパク質の殺虫性を実質的に有するポリペプチドをコードするコード領域を含む。キメラ遺伝子のコード配列が、天然の遺伝子における前記プロモーターと結合しているということは公知ではない。

5'および/または 3'非翻訳領域は、独立して、本来プロモーターもしくはコード領域のいずれかに結合し得るかまたはプロモーターもしくはコード領域のいずれにも結合し得ない。好ましくは 3'または 3'非翻訳領域は天然の遺伝子内のプロモーターと結合し、そして最も好ましくは 5'および 3'領域の両方が天然の遺伝子内のプロモーターと結合している。

本発明がなされた時点での当該分野の状態に基づいて、ワタ細胞内に安定にそして機能的にキメラ遺伝子を導入し得ることを予言できな

DPL 50, DPL 20, DPL 120, DPL 775, Lankart 611, Lankart 57, Paymaster 145, Paymaster HS 24, Stoneville 506, Stoneville 825, Funk 519-2, Funk FC 3008, Funk FC 3024, Funk C 1568R, Funk FC 2005, Funk C 0947B, Funk FC 2028, Funk FC 2017, Funk C 1379, McNair 235, Tomcot SP 21-S, Siokra, Tx-CAB-CS.

好ましい変種は Acala SJ-2, Acala SJC-1, Acala GC 510, Acala SJC-28, Acala SJC-30, Acala B-1644 および Siokra である。Acala SJ-2, Acala GC 510, Acala B-1644, および Siokra が特に好ましい。

「植物細胞」という語は、ワタ植物から誘導されたあらゆる細胞に関する。本発明により包含される細胞のいくつかの例は、生存している植物の部分である分化した細胞；培養における分化した細胞；カルスまたは腫瘍のような未分化組織の細胞；種子；胚；ムカゴおよび花粉を

った。ワタ細胞があらゆるレベルで、そして特に細胞に殺虫性を付与するのに十分なレベルで、殺虫性ポリペプチドを発現するということがまた、全く予言し得なかった。とりわけ、Bt 結晶タンパク質の昆虫毒性を有するポリペプチドと同程度の大きさで不溶性のポリペプチドが植物細胞内に発現されることは特に困難であると考えられていた。

殺虫性であると見なされるために、植物細胞は、Bt からの結晶タンパク質の殺虫性を実質的に有する毒素の殺虫量を含む有しななければならない。殺虫量は、植物細胞内に存在する場合には昆虫の幼虫を殺すかまたは少なくともそれらの摂食を実質的に減少させる量である。

従って、本発明の植物細胞は、殺虫性ポリペプチドを産生する遺伝子を含む有しない植物細胞と比較した場合に、結晶タンパク質またはその他の殺虫剤の施用なしに、またはより少ない量で昆虫の幼虫による攻撃に抵抗できる。

本発明のキメラ遺伝子はワタ植物体内で機能

するプロモーター並びに5'および3'非翻訳配列からなる転写調節配列を含む。これらの配列は独立してあらゆる源例えばウイルス、植物または細菌の遺伝子から誘導され得る。

使用に適したウイルスのプロモーター並びに5'および3'非翻訳配列はワタ植物体内で機能し、そして例えば植物ウイルス例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) から得られる。CaMVはホーン (Hohn) 等 (1982年) 第194-220頁および補遺AないしGにより同定および記載されている。この記載は参照により本明細書に導入する。

CaMVは二重鎖DNAを含む非典型的な植物ウイルスである。少なくとも2つのCaMVプロモーターが植物体内で機能し、CaMVの遺伝子VIの転写を生じるすなわち19Sプロモーターおよび35S転写のプロモーターである。19Sプロモーターおよび35Sプロモーターは、本発明における使用には好ましい植物ウイルスのプロモーターである。

リゴヌクレオチド関連突然変異物 (ゾラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1983年) の使用を含む。

望ましい5'非翻訳領域を得るために、同様の方法を用いても良い。例えば適当なCaMV 19S遺伝子5'非翻訳配列は、ホーン等の文献の第4図および補遺Cに記載されたCaMVゲノムの7342位のEcoRV部位と7643位のBgl II部位との間の領域を分離することにより得られ得る。

本発明における使用に適した植物遺伝子のプロモーター並びに5'および3'非翻訳領域の例はまた、リブローヌ-1, 5-ビスホスフェートカルボキシラーゼおよびクロロフィルa/b-結合タンパク質の小さいサブユニットをコードするそれらの遺伝子を含む。これらの植物の遺伝子領域は、CaMVからの相当する領域を分離するために上記された方法に匹敵する方法において植物細胞から分離され得る [モレリ (Morelli) 等, 1985年参照]。

細菌の遺伝子からの適当なプロモーター並び

CaMV 19Sプロモーターおよび5'非翻訳領域は上記ホーン等の文献の第199頁の第4図に示された遺伝子地図のような制限地図によって、またはホーン等の文献の補遺Cに示す配列から得られ得る。

CaMV 19Sプロモーターおよび場合によって隣接する5'非翻訳領域を分離するために、所望の配列を含むCaMVゲノムの制限断片が選択される。19Sプロモーターおよび5'非翻訳領域を含む適当な制限断片はホーン等の文献の第4図および補遺Cの5384位で始まるPst I部位と5850位で始まるHind III部位との間の断片である。

類似の方法により、CaMVからの35Sプロモーターは下記のように得られ得る。

制限断片における望ましくないヌクレオチドは場合によっては標準法により除去されても良い。望ましくないヌクレオチドを消去するいくつかの適当な方法は、エキソヌクレアーゼ (マニアチス (Maniatis) 等, 1982年) およびオ

に5'非翻訳領域および3'非翻訳領域は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) プラスミドのT-DNA領域に存在するものを含む。適当なアグロバクテリウムプラスミドのいくつかの例は、アグロバクテリウム チュメファシエンシス (*A. tumefaciens*) のTiプラスミドおよびアグロバクテリウム リゾゲネス (*A. rhizogenes*) のRiプラスミドを含む。本発明において有用なアグロバクテリウムのプロモーター並びに5'および3'非翻訳領域は特にオクトピンシンターゼおよびノバリンシンターゼをコードする遺伝子内に存在するものである。これらの配列はCaMVおよび植物プロモーターおよび非翻訳配列を分離するための上記の方法に類似した方法により得られ得る [ベバン (Bevan) 等, 1983年参照]。

キメラ遺伝子のコード領域は、B18-エンドトキシン結晶タンパク質の毒性を実質的に有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。本発明の目的のためにポリペプチドは、

それがBtの亜種からの結晶タンパク質と同様に、類似した範囲の昆虫幼虫に対して殺虫性である場合、Bt δ -エンドトキシン結晶タンパク質の毒性を實質的に有する。いくつかの適当な亜種は、例えば、パテルススリングエンシス クルスタキ変種(Bt var. kurstaki)、パテルス スリングエンシス ベルリナー変種(Bt var. berliner)、パテルス スリングエンシス アレス変種(Bt var. alesti)、パテルス スリングエンシス トルウォルチ変種(Bt var. tolworthi)、パテルス スリングエンシス ソットー変種(Bt var. sotto)、パテルス スリングエンシス デンドロリマス変種(Bt var. dendrolimus)、パテルス スリングエンシス テネブリオニス変種(Bt var. tenebrionis)、パテルス スリングエンシス サンジエゴ変種(Bt var. sandiego)およびパテルス スリングエンシス アイザワイ変種(Bt var. aizawai)を含む。好ましい亜種はBtクルスタキ変種、そして特にBtクルスタキ変種HD1である。

すれかに關すると理解すべきである。

DNA配列の有効部分の少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、そして最も好ましくは少なくとも90%が相同である場合に、通常DNA配列は第二のDNA配列に實質的に相同である。あるものの他への置換が不活動突然変異を構成する場合、2つの異なるヌクレオチドは、實質的な相同を決定するためのコード領域のDNA配列において相同であると見なされる。

このように本発明は、開示されそして特許請求された要求を満足させる殺虫性を有するアミノ酸の配列をコードするあらゆるキメラ遺伝子を含むワタの細胞および植物体を包含する。ヌクレオチド配列が殺虫有効性に關する天然の配列の少なくとも部分に實質的に相同であるものが好ましい。

本発明のキメラ遺伝子により発現されるポリペプチドは、それが少なくともいくつかの同一な抗原決定基を有するから、一般に、天然のBt結晶タンパク質の有する少なくともいくつかの

コード領域はBt内にもともと存在していても良い。また、コード領域は、Bt内に存在する配列とは異なるがしかし遺伝コードの縮重のために等価である配列を含んでいても良い。

キメラ遺伝子のコード配列は天然に生じる結晶タンパク質 δ -エンドトキシンとは異なるポリペプチドをコードしても良いが、しかし結晶タンパク質の昆虫毒性を實質的に依然として有する。そのようなコード配列は通常天然のコード領域の異形(variant)であろう。天然のDNA配列の「異形」は、同一機能を示す天然の配列の変更された形である。異形は突然変異体であっても良く、また合成DNA配列であって良く、そして實質的に相當する天然の配列に相同である。

「實質的な配列相同」は類似の特性を有するタンパク質を産生する他のDNA断片に十分類似したヌクレオチド配列を有するDNA断片；または類似の特性を示す他のポリペプチドに十分類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドのい

免疫学的特性を有するであろう。

従って、本発明のキメラ遺伝子によりコードされるポリペプチドはBtにより産生される結晶 δ -エンドトキシンタンパク質に好ましくは構造的に關連する。Btは約130000ないし140000のMrを有するプロトキシンであるサブユニットを有する結晶タンパク質を産生する。このサブユニットをプロテアーゼまたはアルカリにより開裂し、80000、好ましくは約70000、より好ましくは約60000という低いそして可能性としてより低いMrを有する殺虫性断片を形成する。本発明に係るプロトキシンのそのような断片またはそれらのより小さい部分をコードするキメラ遺伝子は、その断片またはその部分が不可欠の殺虫有効性を有する限りは構成され得る。プロトキシン、プロトキシンの殺虫性断片およびこれら断片の殺虫性部分はその他の分子例えばポリペプチドおよびタンパク質に融合され得る。

本発明における使用に適当なコード領域は、

B1から分離される結晶タンパク質毒素遺伝子から得られても良い。(例えば、PCT出願 WO 86/01536号および米特許第4,448,885号および同第4,467,036号参照。)結晶タンパク質をコードするヌクレオチドの好ましい配列は、下の式(II)で表わされる配列の156ないし3623位のヌクレオチドまたはそのような結晶タンパク質の殺虫性断片をコードするより短い配列として示されるものである。ガイザー(Geiser)等、(1986年)におけるこの配列の開示は参照により本明細書に導入される。

式(1):

10	20	30	40	50	60
GTAAACACCC	TGGGTCAAAA	ATTGATATTT	AGTAAAAATTA	GTGTCACITT	GTGCATTTTT
70	80	90	100	110	120
TCATAAGATG	AGTCATAIGT	TTTAAATTGT	AGTAATGAAA	AACAGTATTA	TATCATAATG
130	140	150	160	170	180
AATTGGIATC	TTAATAAAAG	AGATGGAGGT	AACTTATGGA	TAACAATCCG	AACATCAATG
190	200	210	220	230	240
AATGCATTCC	TTATAATTGT	TTAAGTAACC	CTGAAGTAGA	AGTATTAGGT	GGAGAAAGAA
250	260	270	280	290	300
TAGAAACTGG	TTACACCCCA	ATCGAIAITT	CCTTGTGCGT	AACGCAATTT	CTTTTGAGTG
310	320	330	340	350	360
AATTTGTTC	CGGTGCTGGA	TTTGTGTTAG	GACTAGTTGA	TATAATATGG	GGAATTTTTG
370	380	390	400	410	420
GTCCCTCTCA	ATGGGACGCA	TTTCTTGTA	AAATTGAACA	GTTAATTAAC	CAAAGAATAG
430	440	450	460	470	480
AAGAATTCGC	TAGGAACCAA	GCCATTICTA	GATTAGAAGG	ACTAAGCAAT	CTTTATCAAA
490	500	510	520	530	540
TTTACGCAGA	ATCTTTTAGA	GAGTGGGAAG	CAGATCCTAC	TAATCCAGCA	TTAAGAGAAG
550	560	570	580	590	600
AGATGCGTAT	TCAATTCAT	GACATGAACA	GTGCCCTTAC	AACCGCTATT	CCTCTTTTTG
610	620	630	640	650	660
CAGTTCAAAA	TTATCAAGTT	CCTCTTTTAT	CAGTATATGT	TCAAGCTGCA	AATTACATT
670	680	690	700	710	720
TATCAGTTTT	GAGAGATGTT	TCAGTGTGTTG	GACAAAGGTG	GGGATTTGAT	GCCGCGACTA
730	740	750	760	770	780
TCAATAGTCG	TTATAATGAT	TTAACTAGGC	TTATTGGCAA	CTATACAGAT	CATGCTGTAC
790	800	810	820	830	840
GCTGGTACAA	TACGGGATTA	GAGCGTGTAT	GGGGACCGGA	TTCTAGAGAT	TGGATAAGAT
850	860	870	880	890	900
ATAATCAATT	TAGAAGAGAA	TTAACACTAA	CTGTATTAGA	TATCGTTTCT	CTATTCCGA
910	920	930	940	950	960
ACTATGATAG	TAGAACGTAT	CCAATTTCGAA	CAGTTTCCCA	ATTAACAAGA	GAAATTTATA
970	980	990	1000	1010	1020
CAAACCCAGT	ATTAGAAAAT	TTTGATGGTA	GTTTTGAGG	CTCGGCTCAG	GGCATAGAAG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GAAGTATTAG	GAGTCCACAT	TTGATGGATA	TACTTAACAG	TATAACCATC	TATACGGATG

1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTCATAGAGG	AGAATATTAT	TGGTCAGGGC	ATCAAATAAT	GGCTTCTCCT	GTAGGGTTTT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CGGGGCCAGA	ATTCACITTT	CCGCTATATG	GAACATATGG	AAATGCAGCT	CCACAACAAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTATTGTTGC	TCAACTAGGT	CAGGGCGTGT	ATAGAACATT	ATCGTCCACT	TTATATAGAA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GACCTTTTAA	TATAGGGATA	AATAATCAAC	AACTATCTGT	TCTTGACGGG	ACAGAATTTG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CTTATGGAAC	CTCCTCAAAT	TTGCCATCCG	CTGTATACAG	AAAAAGCGGA	ACGGTAGATT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CGCTGGATGA	AATACCGCCA	CAGAATAACA	ACGTGCCACC	TAGGCAAGGA	TTTAGTCAIC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GATTAAAGCCA	TGTTTCAATG	TTTCGTTCAG	GCTTTAGTAA	TAGTAGTGTA	AGTATAATAA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GAGCTCCTAT	GTTCTCTTGG	ATACATCGTA	GTGCTGAATT	TAATAATATA	ATTCCTTCAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CACAAATTAC	ACAAATACCT	TTAACAAAAT	CTACIAATCT	TGGCTCTGGA	ACTTCTGTGC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
TTAAAGGACC	AGGATTTACA	GGAGGAGATA	TTCTTCGAAG	AACTTCACCT	GGCCAGATTT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CAACCTTAAG	AGTAAATATT	ACTGCACCAT	TATCACAAAG	ATATCGGGTA	AGAATTGCTT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACGCTTCTAC	CACAAATTTA	CAATTCCATA	CATCAATTGA	CGGAAGACCT	ATTAATCAGG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GGAATTTTTT	AGCAACTATG	AGTAGTGGGA	GTAATTTACA	GTCCGGAAGC	TTTAGGACTG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TAGGTTTTAC	TACTCCGTTT	AACTTTTCAA	ATGGATCAAG	TGTATTTACG	TTAAGTGCTC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ATGTCTTCAA	TTCAGGCAAT	GAAGTTTATA	TAGATCGAAT	TGAATTTGTT	CCGGCAGAAG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TAACCTTTGA	GGCAGAATAT	GATTTAGAAA	GAGCACAAAA	GGCGGTGAAT	GAGCTGTTTA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CTTCTTCCAA	TCAAATCGGG	TTAAAAACAG	ATGTGACGGA	TTATCATATT	GATCAAGTAT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CCAATTTAGT	TGAGTGTTTA	TCTGATGAAT	TTTGTCTGGA	TGAAAAAAA	GAATTGTCCG

2170	2180	2190	2200	2210	2220
AGAAAGTCAA	ACATGCGAAG	CGACTTAGTG	ATGAGCGGAA	TTTACTTCAA	GATCCAAACT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TTAGAGGGAT	CAATAGACAA	CTAGACCGTG	GCTGGAGAGG	AAGTACGGAT	ATTACCATCC
2290	2300	2310	2320	2330	2340
AAGGAGGCCA	TGACGTATTC	AAAGAGAATT	ACGTTACGCT	ATTGGGTACC	TTTGATGACT
2350	2360	2370	2380	2390	2400
GCTATCCAAC	GTATTTATAT	CAAAAAATAG	ATGAGTCGAA	ATTAAAGCC	TATACCCGTT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
ACCAATTAAG	AGGGTATATC	GAAGATAGTC	AAGACTTAGA	AATCTATTIA	ATTCGCTACA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
ATGCCAAACA	CGAAACAGTA	AATGTGCCAG	GTACGGGTTC	CTTATGGCCG	CTTTCAGCCC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CAAGTCCAAT	CGGAAAATGT	GCCCATCATT	CCCATCATT	CTCCTTGGAC	ATTGAIGTTG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GATGTACAGA	CTTAAATGAG	GACTTAGGTG	TATGGGTGAT	ATTCAAGATT	AAGACGCAAG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
ATGGCCATGC	AAGACTAGGA	AATCTAGAAT	TTCTCGAAGA	GAAACCATT	GTAGGAGAAQ
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CACTAGCTCG	TGTGAAAAGA	GCGGAGAAAA	AATGGAGAGA	CAAACGTGAA	AAATTGGAAT
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GGGAAACAAA	TATTGTTTAT	AAAGAGGCAA	AAGAATCTGT	AGATGCTTTA	TTTGTAAGCT
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CTCAATATGA	TAGATTACAA	GCGGATACCA	ACATCGCGAT	GATTTCATGCG	GCAGATAAAC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GCGTTCATAG	CATTCGAGAA	GCTTATCTGC	CTGAGCTGTC	TGTGATTCCG	GGTGTCAATG
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CGGCTATTTT	TGAAGAATT	GAAGGGCGTA	TTTTCACGTC	ATTCTCCCTA	TATGATGCCA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GAAATGTCAT	TAAAAATGGT	GATTTTAATA	ATGGCTTATC	CTGCTGGAAC	GTGAAAGGGC
3070	3080	3090	3100	3110	3120
ATGTAGATGT	AGAAGAACAA	AACAACCACC	GTTCCGTCCT	TGTTGTTCCG	GAATGGGAAG
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CAGAAGTGTC	ACAAGAAGTT	CGTGTCTGTC	CGGGTCGTGG	CTATATCCTT	CGTGTACACG
3190	3200	3210	3220	3230	3240
CGTACAAGGA	GGGATATGGA	GAAGGTTGCG	TAACCATTCA	TGAGATCGAG	AACAATACAG
3250	3260	3270	3280	3290	3300
ACGAACTGAA	GTTTAGCAAC	TGTGTAGAAG	AGGAAGTATA	TCCAAACAAC	ACGGTAACGT

3310	3320	3330	3340	3350	3360
GTAATGATTA	TACTGCCGACT	CAAGAAGAAT	ATGAGGGTAC	GTACACTTCT	CGTAATCGAG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GATATGACGG	AGCCTATGAA	AGCAATTCTT	CTGTACCAGC	TGATTATGCA	TCAGCCTATG
3430	3440	3450	3460	3470	3480
AAGAAAAAGC	ATATACAGAT	GGACGAAGAG	ACAATCCTTG	TGAATCTAAC	AGAGGATATG
3490	3500	3510	3520	3530	3540
GGGATTACAC	ACCACTACCA	GCTGGCTATG	TGACAAAAGA	ATTAGAGTAC	TTCCCAGAAA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
CCGATAAGGT	ATGGATTGAG	ATCGGAGAAA	CGGAAGGAAC	ATTCATCGTG	GACAGCGTGG
3610	3620	3630	3640	3650	3660
AATTACTTCT	TATGGAGGAA	TAATATATGC	TTTATAATGT	AAGGTGTGCA	AATAAAGAAT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
GATTACTGAC	TTGTATTGAC	AGATAAATAA	GGAAATTTTT	ATATGAATAA	AAAACGGGCA
3730	3740	3750	3760	3770	3780
TCACTCTTAA	AAGAATGATG	TCCGTTTTTT	GTATGATTTA	ACGAGTGATA	TTTAAATGTT
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TTTTTTGCGA	AGGCTTTACT	TAACGGGGTA	CCGCCACATG	CCCATCAACT	TAAGAATTTG
3850	3860	3870	3880	3890	3900
CACTACCCCC	AAGTGTCAAA	AAACGTTATT	CTTTCIAAAA	AGCTAGCTAG	AAAGGATGAC
3910	3920	3930	3940	3950	3960
ATTTTTTATG	AATCTTTCAA	TTCAAGATGA	ATTACAATA	TTTTCTGAAG	AGCTGTATCG
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TCATTTAACC	CCTTCTCTTT	TGGAAGAACT	CGCTAAAGAA	TTAGGTTTTG	TAAAAAGAAA
4030	4040	4050	4060	4070	4080
ACGAAAGTTT	TCAGGAAATG	AATTAGCTAC	CATATGTATC	TGGGGCAGTC	AACGTACAGC
4090	4100	4110	4120	4130	4140
GAGTGATTCT	CTCGTTCGAC	TATGCAGTCA	ATTACACGCC	GCCACAGCAC	TCTTATGAGT
4150	4160	4170	4180	4190	4200
CCAGAAGGAC	TCAATAAACG	CTTTGATAAA	AAAGCGGTTG	AATTTTTGAA	ATATATTTTT
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TCTGCATTAT	GGAAAAGTAA	ACTTTGTAAA	ACATCAGCCA	TTTCAAGTGC	AGCACTCAGC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
TATTTTCAAC	GAATCCGTAT	TTTAGATGCG	ACGATTTTCC	AAGTACCGAA	ACATTTAGCA
4330	4340	4350	4360		
CATGTATATC	CTGGGTCAGG	TGGTTGTGCA	CAAACCTGCAG		

式(II)の156ないし3423位のヌクレオチドにより規定されるコード領域は、式(II)で表わされる配列のポリペプチドをコード化する。

式(Ⅱ):

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10
Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30
Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50
Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70
Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90
Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110
Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130
Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150
Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser	170
Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln	180
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn	190
Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile	200
Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp	210
Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly	220
Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn	230
Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	240
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr	250
Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val	260
Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn	270
Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe	280
Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser	290
Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu	300
Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His	310
Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	320
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly	330
Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Thr	340
Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile	350
Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg	360
Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro	370
Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu	380
Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr	390
Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	400
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu	410
Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val	420
Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu	430
Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe	440
Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala	450
Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala	460
Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln	470
Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr	480
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys	490

Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu	500
Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr	510
Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser	520
Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala	530
Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser	540
Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn	550
Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn	560
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly	570
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly	580
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val	590
Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp	600
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr	610
Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala	620
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser	630
Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val	640
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn	650
Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys	660
Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys	670
Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu	680
Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg	690
Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp	700
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly	710
Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	720
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr	730
Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu	740
Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln	750
Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp	760
Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala	770
Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr	780
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser	790
Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His	800
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys	810
Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp	820
Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly	830
His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu	840
Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu	850
Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp	860
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	870
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu	880
Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln	890
Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile	900
Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val	910
His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu	920
Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala	930
Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe	940
Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	950
Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly	960
Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val	970
Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser	980
Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu	990
Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly	1000
Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr	1010
Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr	1020
Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	1030
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu	1040
Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn	1050

Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	1060
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr	1070
Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val	1080
Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	1090
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn	1100
Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp	1110
Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr	1120
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp	1130
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu	1140
Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu	1150
Leu Leu Met Glu Glu End	1156

従って、本発明はさらに、式(Ⅷ)で表される配列を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドの殺虫性部分にも関する。

さらに、いくつかの Bt 株の毒素は鱗翅目の昆虫以外のものに毒性であることがわかった。特に Bt テネブリオニス変種の毒素は甲虫目の昆虫に毒性である。Bt サンジェゴ株の甲虫目の昆虫に対する毒性および関連する毒素遺伝子の配列は、EP-0202739 号および EP-0213818 号に開示されている。

本発明のキメラ遺伝子を植物細胞内に導入するため、遺伝子を最初にベクター内に挿入する。遺伝子が形質転換に十分な量で利用できない場合には、ベクターは、宿主細胞内での複製により増幅させても良い。増幅のための最も慣用の宿主細胞は細菌細胞または酵母細胞である。十分量のキメラ遺伝子が利用できる場合、それを本発明に従ってワタ細胞または組織内に導入する。遺伝子のワタ植物細胞または組織内への導入は、複製のために用いられたのと同じベク

ターによっても、また異なるベクターによっても良い。

キメラ遺伝子を複製するのに適当な細菌の宿主細胞のいくつかの例は、エスケリシア (*Escherichia*) の属のもの、例えば大腸菌 (*E. coli*) およびアグロバクテリウム属のもの、例えばアグロバクテリウム チュメファシエンスまたはアグロバクテリウム リゾゲネスからなる群から選択されるものを含む。細菌内で非相同遺伝子をクローニングする方法は、米国特許第 4,237,224 号および同第 4,468,464 号に記載されている。

大腸菌内で Bt の結晶タンパク質をコードする遺伝子の複製は、ウォング (Wong) 等 (1983 年) に記載されている。

本発明のキメラ Bt 遺伝子を複製する好ましい細菌宿主細胞はアグロバクテリウムである。アグロバクテリウム内で遺伝子を増幅させる利点は、さらに遺伝子操作を行うことなく、増幅された遺伝子を植物細胞内に挿入するため、そ

のアグロバクテリウムを次に用い得るということである。

本発明の遺伝子を複製するのに適当な酵母宿主細胞のいくつかの例は、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属のものを含む。

カメラ遺伝子が挿入されそして適当な宿主細胞例えば細菌または酵母内で複製するベクターは、本発明の遺伝子を増殖するために使用しても良い。ベクターは例えばファージまたはプラスミドから誘導され得る。本発明において有用なファージから誘導されるベクターのいくつかの例は M13 および ラムダ (λ) から誘導されるものを含む。M13 から誘導されるいくつかの適当なベクターは、M13mp18 および M13mp19 を含む。 λ から誘導されるいくつかの適当なベクターは、 λ gt11、 λ gt7 および λ シャロン (Charon) 4 を含む。

細菌内での複製に特に適当であるプラスミドから誘導されるいくつかのベクターは pBR322 [ボリバー (Bolivar) 等, 1977年]; pUC

18 および pUC19 [ナルランダー (Narander) 等, 1983年]; および TI プラスミド [ベバン (Bevan) 等, 1983年] を含む。細菌内で遺伝子を増殖する好ましいベクター pBR322、pUC18 および pUC19 である。

細菌内での複製に適したカメラ遺伝子を製造するために、プロモーター配列、5' 非翻訳配列、コード配列および 3' 非翻訳配列を適当なベクター例えば上記のベクター内に挿入し、適当な順序で集める。適当であるためには、ベクターは宿主細胞内で複製できなければならない。

プロモーター、5' 非翻訳領域、コード領域および 3' 非翻訳領域は本発明のカメラ遺伝子を構成し、最初にベクターの外で1つのユニットに結合されて、そして次にベクター内に挿入されても良い。また、カメラ遺伝子の部分はベクター内に別々に挿入されても良い。ベクターはまた好ましくは、ベクターを含む細胞の選択を可能にする宿主細胞に特徴を与える遺伝子も含む。好ましい特徴は抗生物質耐性である。有用

な抗生物質のいくつかの例はアンピシリン、テトラサイクリン、ハイグロマイシン、G418、クロラムフェニコール、カナマイシンおよびネオマイシンを含む。

ベクター内での遺伝子の挿入または集合は、標準法例えば組換え DNA (マニアチス等, 1982年) および相同組換え (ヒンネン (Hinnen) 等, 1978年) の使用により行われる。

公知の組換え DNA 法を使用して、ベクターを切り、所望の DNA 配列をベクターの切片の間に挿入し、そして所望の DNA 配列の端部をベクターの相当する端部に連結する。

ベクターは適当な制限エンドヌクレアーゼにより非常に便宜的に切断される。いくつかの適当な制限エンドヌクレアーゼはプラント末端を形成するもの、例えば Sma I、Hpa I および EcoRV、および粘着端を形成するもの、例えば EcoRI、Sac I および BamHI を含む。

所望の DNA 配列は通常、大きい DNA 分子、例えば染色体、プラスミド、トランスポゾンま

たはファージの部分として存在する。所望の DNA 配列はその源から切り出され、そして端部が切断されたベクターの端部に結合され得る。ように場合によっては修飾される。所望の DNA 配列と切断されたベクターの端部がプラント末端である場合には、それらはプラント末端リガーゼ例えば T4 DNA リガーゼにより結合される。

望ましい DNA 配列の末端は粘着端の形態で切断されたベクターの末端に結合させても良く、その場合には粘着端リガーゼは T4 DNA リガーゼであって良い。その他の適当な粘着端リガーゼは例えば大腸菌 DNA リガーゼを含む。

粘着端は所望の DNA 配列およびベクターを同一の制限エンドヌクレアーゼで切断することにより非常に便宜的に形成される。そのような場合、望ましい DNA 配列および切断されたベクターはお互いに相補的な粘着端を有する。

粘着端は、所望の DNA 配列の末端および切断されたベクターに相補的なホモポリマーテールを、末端デオキシヌクレオチルトランスフ

エラーゼを使用することにより添加するか、またはリンカーとして公知の特定の制限エンドヌクレアーゼにより認識される合成オリゴヌクレオチド配列を添加し、そしてエンドヌクレアーゼで該配列を開裂することによっても製造される(例えばマニアチス等、1982年参照)。

本発明のBt毒素遺伝子は、アグロバクテリウム内に存在するある種のプラスミドを利用することにより植物細胞内に直接導入され得る。これらのプラスミドは、アグロバクテリウムにより感染された植物細胞のゲノム内に自然に挿入される領域を含む。挿入された領域はT-DNA(転移されたDNA)と呼ばれる。これらのプラスミドは、例えばアグロバクテリウム チュメファシエンシスのTi(腫瘍誘導)プラスミドおよびアグロバクテリウム リゾゲネシスのRi(根誘導)プラスミドを包含し、T-DNA境界配列を含み、そのうちの少なくとも1つは、プラスミドから感染植物細胞のゲノムへのT-DNA領域の転移に必要であると考えられている。天然

のTiおよびRiプラスミドはまたその位置が、T-DNA領域の外側であると考えられている毒性領域も含む。

改良された系において、毒性領域は、T-DNAを含むプラスミドとは異なるプラスミド上に存在し得る。そのような毒性領域含有プラスミドは、ヘルパープラスミドと呼ばれる。

自然に現われるT-DNA領域は、腫瘍形成性であり、そして植物腫瘍を引き起こす。これらのT-DNA領域の腫瘍形成部位は、所望のDNA配列の挿入の前またはそれと同時に、部分的または全体が除去され得る。そのような変更T-DNA領域を含むプラスミドは無毒化されていると言われる。

本発明における使用に適した遺伝子は、当該技術分野において公知の方法により、T-DNAベクター系内に集められるか、または挿入される(パートンおよびチルトン(Barton and Chilton)、1983年;チルトン、1985年)。T-DNAベクターは、腫瘍形成性であって良く

[ハーナルスティーンズ(Hernalsteens)等、1980年]、部分的に無毒化されても良く(パートンおよびチルトン、1983年)、完全に無毒化されても良く(ザムブリスキー(Zambryski)等、1983年)、または合成T-DNA境界領域配列を有する人工T-DNAベクターに基づいていても良い(ウォング(Wang)等、1984年)。T-DNA境界領域を含むいくつかの適当な無毒化ベクターは、アン(An)等(1985年)に記載されているpGA436、pGA437およびpGA438; pMON120(フラレー(Fraley)等、1983年参照)およびpCIB10(ロススタイン(Rothstein)等、1987年参照)を包含する。T-DNAの転移は、アグロバクテリウムを植物細胞のプロトプラストまたは傷つけた植物組織と培養することにより通常行われる(カプラン(Caplan)等、1983年参照)。

Bt毒素またはBt様毒素をコードするカメラ遺伝子に加えて、ベクターは好ましくはさらに、ベクターを含まない細胞の存在下でベクターを

含むワタ植物細胞の選択またはスクリーニングを可能にするDNA配列からなる。そのような選択できるまたはスクリーニングできるマーカーは、本発明のカメラ遺伝子が導入されるベクター内にもともと存在していても、またはカメラ遺伝子が導入される前または後のいずれかにベクター内に導かれても良い。また、選択できるまたはスクリーニングできるマーカー遺伝子またはそれらの部分は最初に所望のカメラ遺伝子またはそれらのあらゆる部分に結合させ、そして再結合された遺伝子または遺伝子セグメントをベクター内にユニットとして導入しても良い。選択できるまたはスクリーニングできるマーカーはそれ自体カメラであって良い。

好ましい選択できるマーカーは抗生物質耐性をコードする遺伝子である。遺伝子は細胞内で発現されて形質転換され得なければならぬ。細胞を抗生物質を含有する培地中で培養し得、そしてその培地中で生存する選り分けられた能力を有するベクターを含むそれらの細胞が選択され

る。クロラムフェニコール、カナマイシン、ハイグロマイシン、G418または原則としてその他の抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子が選択できるマーカーとして有用である。

抗生物質耐性を与える遺伝子のいくつかの例は、例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼ〔カナマイシンおよびG418耐性、ベルテン(Velten)等、1984年〕；ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ〔ハイグロマイシン耐性、ファンデンエルツェン(van den Elzen)等、1985年〕；およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードするものを含む。

遺伝子操作ベクターを含む植物細胞を同定するための組織培養液中のスクリーニングできるマーカーとして主として有用な遺伝子の例は、染色体遺伝子産物を有する酵素をコード化する遺伝子である。例えば、遺伝子が酵素 β -ガラクトシダーゼをコード化する場合、植物細胞は染色体遺伝子の基質Xgal(5-クロロ-4-

プロモ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド)を含有する組織培養培地上でプレーティングし、そして適当な条件下で、この遺伝子のコピーを含有する植物細胞を、 β -ガラクトシダーゼがXgalを開裂する時に解離される材料インジゴにより染色する。

本発明によるキメラ遺伝子の植物体内への導入は、アグロバクテリウムからワタ植物細胞内に遺伝子を導入することができるあらゆるT-DNA誘導ベクター系で行われ得る。ベクター系は例えば共組込み系(co-integrate system)〔コマイ(Comai)等、1983年；ザムブリスキー(Zambryski)等、1983年〕例えばチルトン(1985年)により記載されるようなスプリット-エンドベクター系(split-end vector system)〔フラレー等、1985年〕であって良い。一方、ベクター系は、二元系(binary system)〔デフラモン(De Fromond)等、1983年；ホークマ(Hoekema)等、1983年〕またはT-DNA内への遺伝子の同型遺伝子接合

により操作されたTiプラスミド〔マツケおよびチルトン(Matske and Chilton), 1981年〕であって良い。その他に、T-DNAがプラスミド上にある、そして毒性遺伝子が染色体DNA上にある系が可能である。

好ましいT-DNAベクター系は、二元ベクター系であり、そして特にpCIB10(ロススタイン等、1987年)を利用する系である(第10図参照)。

二元ベクター系内への組換えDNA操作による非相同遺伝子の導入は、クリー(Klee)等により記載されている。T-DNA内への遺伝子の挿入は、二重組換え戦略(マツケおよびチルトン、1981年)；一重組換え戦略(コマイ等、1983年；ザムブリスキー等、1983年)；またはT-DNAに反復のない一重組換え戦略(フラレー等、1985年)を利用する相同組換えによりチルトン(1985年)により記載されるように行っても良い。

キメラ遺伝子を含むベクターがアグロバクテ

リウム内に集まらない場合、それらは当該技術分野で公知の方法によりアグロバクテリウム内に導入されても良い。これらの方法は、形質転換および接合を包含する。

形質転換は細菌に裸のDNAを添加することを含む。アグロバクテリウムは、凍結および融解により裸のDNAの導入を受けやすくされても良い。アグロバクテリウムの形質転換はホルスターズ(Holsters)等(1978年)により記載されている。

接合は、所望のベクターを含有する細胞、通常大腸菌とアグロバクテリウムとの交配を含む。この方法はコマイ等(1983年)およびチルトン等(1976年)により記載されている。

アグロバクテリウム種はワタ植物細胞内に遺伝子を導入し得るアグロバクテリウムのあらゆる株であり得る。いくつかの適当な例は、アグロバクテリウム チュメファシエンス、アグロバクテリウム リゾゲネスおよびアグロバクテリウム ラジオバクターを包含する。

キメラ遺伝子を含む形質転換されたワタ植物細胞は、培養液中に維持され得るか、または生長する植物体に再生され得る。発現は植物細胞を殺虫性にするのに十分な効率であることが好ましい。

培養液中にある特定の植物細胞を維持することができる培地は、その特定種のワタ植物細胞に依存している。例えば、いくつかの適当な培地は、約10mg/Lの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸およびムラシグおよびスクッグの無機塩（ムラシグおよびスクッグ（Murashige and Skoog），1962年）またはガムボルクのB-5無機塩（ガムボルク（Gamborg）等，1968年）のいずれかを含む。

発芽および再生し得るワタ（ゴッソビウム種）の胚は、前胚細胞塊を増殖させ、そしてそれから細胞懸濁培養系中で胚を増殖させることによる体細胞の胚形成を経て効率良く産生され得る。

本方法は、例えば約1000個の球形の胚の標

好ましくは約7日齢のものである。胚軸は長軸方向に薄片に切り、そして例えば1と20mm、好ましくは約2mmの都合の良い切片に切る。子葉組織は1と400mm²、好ましくは5と100mm²、そして最も好ましくは約10mm²の切片に切る。

この操作から誘導される体細胞胚は、本方法による胚形成性カルスを得るための最も好ましい源である。

体細胞胚は、例えば移植片の源として子葉および胚軸組織のための上記の方法を用いることにより入手され得る。第1葉期以前に取ったあらゆる体細胞胚が適当である。体細胞胚の大きさは決定的ではない。好ましくは体細胞胚は長さが約5mmより短い。

成熟ワタ植物体からの幼若組織は茎端の先端10cm、好ましくは約5cmを摘出することにより慣用的に入手されても良い。茎および葉柄組織は長軸方向に薄片に切り、そして胚軸の場合と同じ大きさの切片に切る（上記参照）。葉組織は子葉組織の場合と同じ大きさの切片に切る

準250mlデロング（De Long）フラスコ中で、それから約1000個の成熟胚および約50個の植物体が得られる製造を可能にする。

本方法により製造されたワタ植物体は、栽培種であっても野生種であっても良い。栽培種のワタ植物体が好ましい。

工程a：胚形成性ワタカルス

第1工程は、ワタ外植組織からワタカルス形成を誘導することである。適当なワタ外植組織のいくつかの例は、体細胞胚、成熟および未成熟接合胚、実生からの子葉または胚軸、および成熟植物体からの幼若組織を含む。体細胞胚および実生の子葉または胚軸が好ましい。

接合胚は、例えば胚珠からの摘出により入手しても良い。胚珠は、好ましくは受粉後約7ないし30日後、好ましくは約10ないし21日後、そして最も好ましくは約12ないし14日後摘出される。

子葉および胚軸は、幼若な実生から入手しても良い。実生は好ましくは約3と21日齢の間、より好ましくは約4と9日齢の間、そして最も

（上記参照）。

ワタ植物組織を、約20ないし40℃、好ましくは23ないし35℃、より好ましくは約31℃で適当なカルス誘導培地上に置く。組織からカルスを誘導することができるあらゆる培地を本再生方法において使用しても良い。培地は、固体培地がより慣用的であるから好ましいけれども、液体であっても固体であっても良い。

本発明の条件下でカルスを誘導することができる1つの培地は、無機塩、ビタミン、炭素源、オーキシンおよびサイトカイニンを含む。培地は、pHを3.5と7.5の間、好ましくは4.5と6.5の間、そして最も好ましくは約5.7に調整する。

カルス誘導に寄与し得るあらゆる無機塩およびビタミンが適当である。適当な無機塩およびビタミンのいくつかの例は、ムラシグおよびスクッグ（1962年）（MS）およびガムボルク等（1968年）（B-5）により記載されたものを包含する。もう1つの例は、チェング（Cheng）

等(1980年)により記載されたMSまたはゲムボルクのB-5培地の改良物である。好ましい無機塩はMS無機塩である。好ましいビタミンは、ゲムボルクのB-5ビタミンである。

炭素源はカルスを生長させ得るあらゆる炭素源であって良い。好ましい炭素源は糖および糖の誘導体を包含する。好ましい糖はグルコースとショ糖である。組織の褐色化を減らすためにグルコースを含有するカルス誘導培地中でカルスを創始させ、そして次にショ糖を含有するカルス誘導培地に該カルスを移すことは特に望ましい。

炭素源の濃度は5ないし60g/L、好ましくは約30g/Lである。

カルス誘導培地中に存在するオーキシンはカルスを誘導し得るあらゆるオーキシンであり得る。いくつかの適当なオーキシンは、 α -ナフタレン酢酸、ピクロラム、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、インドール-3-酢酸、インドール-3-

-乳酸、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-酢酸、およびp-クロロフェノキシ酢酸を含む。好ましいオーキシンは α -ナフタレン酢酸である。

カルス形成を誘導することができるオーキシンのあらゆる濃度が本発明の方法において使用し得る。適当な濃度は0.1ないし10mg/Lである。特にオーキシンが α -ナフタレン酢酸である場合、好ましい濃度は、約2mg/Lである。

カルス誘導培地中に存在するサイトカイニンは、カルスを誘導することができるあらゆるサイトカイニンであり得る。いくつかの適当なサイトカイニンは、カイネチン、6-ベンジルアデニン、2-イソペンテニルアデニンおよびゼアチンを含む。好ましいサイトカイニンはカイネチンである。

カルス形成を誘導することができるサイトカイニンのあらゆる濃度が本発明の方法において使用し得る。適当な濃度は0.1ないし10mg/Lである。特にサイトカイニンがカイネチンであ

る場合、好ましい濃度は1mg/Lである。

培地が固体である場合、それは固化を引き起こす成分、例えば約0.8%アガー例えばアガノーブル(Agar Noble)(ディフコ(Difco))または約0.8%アガロースを含有する(本明細書において全ての%は重量に基づいている)。

カルス誘導培地上でカルスを形成するのに十分な期間組織を培養する。例えば、炭素源としてグルコースを含有するカルス誘導培地上で組織を培養し得る。5週間の誘導期間が典型的である。副次培養は褐色化を防止するために必要な時行われる。週毎の副次培養が好ましい。

形成するカルスは組織化されていなくても、また前胚細胞塊、胚形成性カルスおよび/または胚を含有しても良い。通常、胚軸または子葉を外植源として用いる場合、カルスは組織化されていないように見える。体細胞胚を外植源として用いる場合、少なくとも一部のカルスは、淡黄色および結節により特色づけられる胚形成性カルスからなるように見える。

生成するカルスを次いで、5ヶ月までの期間の間に、炭素源としてショ糖を含有すること以外カルス誘導培地と同様であるカルス副次培養培地に移すことは有利であり得る。ショ糖含有カルス誘導培地上、1ヶ月後の新鮮培地中での1ヶ月または2ヶ月の副次培養が好ましい。

カルスは暗所で誘導され得るが、しかし好ましくは明所で誘導される。光線は例えば0.5ないし150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($=4.175$ ないし 12525 ルクス)の強度を有する。

工程b: 前胚細胞塊の塊状集合体

前胚のまたは増殖胚の細胞塊の生長を促進する液体培地中に工程(a)からのカルスを懸濁する。細胞密度が低いことは重要である。それ故に、培地1ml当たり40mg以下、好ましくは15mg以下そしてより好ましくは5mg以下のカルスが懸濁される。

工程(b)における有用な培地は、前胚細胞塊を誘導することができるあらゆる培地であり得る。培地は無機塩、ビタミン、炭素源およびオーキ

シンからなる。培地はまた有機窒素源、サイトカイニン、アミノ酸およびその他の追加物例えばカゼイン水解物またはココナツ水を含育しても良い。

無機塩およびビタミンは工程(a) (上記)と同じであって良い。MS無機塩およびB-5ビタミンが好ましい。

炭素源は工程(a) (上記)と同じであって良い。炭素源の濃度は0.1ないし100g/Lである。特に炭素源がシロ糖である場合には約20g/Lが好ましい。

オーキシンは工程(a)において使用されたオーキシンのうちから選択され得る。好ましいオーキシンは、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸およびピクロラムである。ピクロラムが最も好ましい。

工程(b)においてオーキシンの濃度は比較的低い。正確な濃度は使用される特定のオーキシンに依存する。比較的低いオーキシン濃度は、懸濁培養培地において通常使用されるものに一般に類似しており、そして工程(c)において使用さ

れる相当するオーキシン濃度より十分に低い。ピクロラムが工程(b)において使用されるオーキシンである場合、濃度は0.01ないし5mg/L、好ましくは0.1ないし1mg/L、そして最も好ましくは約0.5mg/Lである。2,4-ジクロロフェノキシ酢酸が工程(b)において使用されるオーキシンである場合、濃度は0.01ないし0.5mg/L、好ましくは0.05ないし0.25mg/L、そして最も好ましくは約0.1mg/Lである。

前胚細胞塊の誘導は、空気を通した培地中、20ないし35℃、好ましくは22ないし33℃、そして最も好ましくは25ないし31℃の温度で好ましくは行われる。当該技術分野において公知の方法、例えば振盪により培地に空気を通して良い。工程(b)は暗所または約75 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (=62625ルクス)まで、好ましくは5と10 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (=4175と835ルクス)の間の暗所で行われ得る。

前胚細胞塊の塊状集合体が形成され、そして迅速に増殖し始めるまで好ましくは副次培養す

ることなしに、カルスを培地中に維持する。迅速な増殖の開始は通常3ないし8週の間、より典型的には5ないし7週の間に起こる。誘導期間の間、この期間は培地を乱さないことが好ましいけれども、培地を新鮮培地に置き換えても良い。

カルスから前胚細胞塊の塊状集合体への変化は、植物組織培養の分野における通常の熟練者にとっては容易にわかるであろう。それは淡黄色および前胚細胞塊の塊状集合体により特色づけられている。

前胚細胞塊の塊状集合体が一旦迅速に増殖し始めると、それらは工程(c)に記載の培地に直接導かれ得るか、またはそれらは褐色化を防止するために副次培養されても良い。3ないし7日毎、好ましくは5ないし7日毎の副次培養が慣用的である。細胞塊は副次培養なしで約14日間生存する。

工程(c): 細かく分散させた前胚細胞塊

工程(b)からの前胚細胞塊の塊状集合体は、該

集合体を細かく分散させ得る液体培地に移される。その培地は、工程(c)の培地が比較的高濃度のオーキシンからなること以外、工程(b)に記載のものと同じであって良い。オーキシンは工程(a)において使用されたあらゆるオーキシンであり得る。好ましいオーキシンは2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸および2,4-ジクロロフェノキシ酢酸である。

オーキシンの濃度は使用される特定のオーキシンに依存している。工程(c)の培地中のオーキシン濃度は、懸濁培養¹¹²地に通常用いられる濃度よりも一般に高いか、または少なくともその範囲の最高値であり、そしてあらゆる場合において、工程(b)において用いられる相当するオーキシン濃度より十分高い。

例えば、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸が工程(c)の培地中のオーキシンである場合、濃度は約0.5ないし100mg/L、好ましくは1ないし10mg/L、そして最も好ましくは約25ないし75mg/Lであり得る。

オーキシンの濃度および可溶性のある同一性を除いて、工程(c)における培地、濃度および光量は工程(b)に記載のものと同一であって良い。

前胚細胞塊の塊状集合体より小さくなり、より細かく分散された前胚細胞塊になるまで工程(c)の条件を維持する。より小さい、より細かく分散された前胚細胞塊の出現は、当該技術分野の熟練者には容易にわかるであろう。これらの細胞塊は、それらの黄色、平滑表面、中間の濃度および小さい大きさを特徴とする。より小さい、より細かく分散された細胞塊への変化は、6週間、典型的には2週間以内に通常起こる。

小さい細かく分散された前胚細胞塊の培養物は無期限に維持されても、そして活性な増殖を維持するように間次培養しても良い。例えば3ないし28日毎、好ましくは5ないし10日毎に間次培養することは慣用的である。

工程d: 成熟胚

より小さい、より細かく分散された前胚細胞塊を、成熟胚の生長を誘導する培地に添加する。

有機窒素源の濃度は、使用される特定の化合物に依存している。有機窒素源としてのグルタミンの効果的濃度は2ないし260mM、好ましくは5ないし100mM、そして最も好ましくは10ないし50mMである。

工程(d)の培地はオーキシンを含有し得る。オーキシンは胚生長の初期の段階の間望ましいが、しかし後期の段階の間は望ましくない。それ故に、オーキシンが存在するならば、それらは生長のハート形段階までにだけ存在することが好ましい。従って、胚はオーキシンを含有しない培地に移される。

オーキシンが存在するならば、その濃度は0.01ないし0.1mg/Lであって良い。

オーキシンは、工程(a)において有用なオーキシンの1つであって良い。好ましいオーキシンはピクロラムおよび2,4-ジクロロフェノキシ酢酸である。

工程(d)の培地中、暗所または明所で20ないし35℃の温度で胚を培養しても良い。光線の

培地は好ましくは液体である。

胚は成熟し、そして発芽することができる前に、多くの生長段階を通過する。これらの段階は、球形の、ハート形の、魚雷形の、そして成熟した段階を包含する。段階の名称は、胚のおおよそその形に基づいている。

工程(d)において有用な培地は、成熟胚の生長を誘導するあらゆる培地であり得る。1つの有用な培地は、無機塩、ビタミン、炭素源および還元窒素を含有する有機化合物からなる。

塩およびビタミン並びにそれらの濃度は、工程(a)に記載のものと同じであって良い。炭素源はまた工程(a)に記載の炭素源の1つであっても良い。炭素源の濃度は約1ないし10g/L、好ましくは約2ないし6g/Lである。好ましい炭素源はショ糖である。

有機窒素源は、工程(d)の培地に添加した場合、成熟胚の生長を誘導するようなあらゆる化合物であり得る。好ましい化合物はアミノ酸である。好ましいアミノ酸はグルタミンである。

強度は、例えば5ないし75 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (=62625ルクス)であって良い。

胚が魚雷形または成熟段階に成熟するまで、胚を工程(d)の培地中に維持する。植物組織培養の分野における熟練者は、胚が形成するような球形の、ハート形の、魚雷形のそして成熟した胚を識別することができるであろう。胚は典型的には2ないし5週で、通常3ないし4週で成熟する。ハート形段階にオーキシン含有培地から非含有培地に移すことを除いて、胚を間次培養すること、または胚を新鮮な培地に移すことは通常不要である。

工程e: 発芽

発芽を誘導し得る固体培地上に成熟胚を置く。培地は無機塩、ビタミンおよび炭素源からなる。培地を適当な固化剤例えばゲルライト(Gelrite) (ケルコ (Kelco)、カリフォルニア、サンジェゴ)、アガロースまたはアガーで固化させる。

硝酸塩が高濃度で存在し、アンモニウムが存

在しないか、または非常に低濃度で存在するかのいずれかであるという変更をした工程(a)に記載の無機塩を使用し得る。硝酸塩の濃度は20ないし60mM、好ましくは30ないし60mM、より好ましくは35ないし45mMであって良い。アンモニウムイオンの濃度が5mM以下であるべきである。

炭素源は好ましくは糖である。好ましい糖はシロ糖である。炭素源の濃度は使用される特定の炭素源に依存する。例えば、シロ糖が炭素源である場合、濃度は0.1ないし4重量%、好ましくは0.5ないし4重量%、より好ましくは1ないし3重量%である。

無機窒素源は所望により工程(e)の培地中に存在する。有機化合物は、好ましくは発芽を支持し得るアミノ酸またはアミノ酸の混合物である。好ましいアミノ酸またはその混合物はグルタミンまたはカゼイン水解物である。

無機窒素源の濃度は、使用される特定の化合物に依存する。例えば、化合物がグルタミンで

ある場合、濃度は2ないし50mM、好ましくは5ないし30mM、より好ましくは10ないし20mMであり得る。化合物がカゼイン水解物または変性カゼイン水解物である場合、濃度は100ないし3000mg/L、好ましくは1000ないし2800mg/L、より好ましくは1500ないし2500mg/Lである。

好ましくは、発芽は有機窒素源を含有する培地上で若芽が生長するまで起こる。根の伸長のための有機窒素源を含有しない培地に、次いで胚を移す。

培地中の胚の密度は、生長に自己阻害を引き起こすものより低い密度に限られる。適当な密度は、約10ないし75ml、好ましくは25ないし50ml、そして最も好ましくは約35mlの培地を含有する9cmのペトリ皿中に1ないし100個の胚を含む。

工程(e)の培地は、20ないし30℃に維持される。好ましくは、温度は約25℃である。

ある光線は工程(e)において必要である。5な

いし150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (=4175と12525ルクス)の間、好ましくは10ないし75 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (=835と62625ルクス)の間の光線の強度が適当である。

胚が発芽するまで、典型的には1ないし20日、通常2ないし4日、工程(a)の培地上に胚を維持する。当業者は胚が発芽した時を知るのである。

工程f: 植物体

発芽に続いて、小植物体を植物体への生長のための土壌に移す。移された植物体をガラスで覆い、高湿度に維持する。ガラス下で1週間後、小植物体または植物体の特別な処置は必要ない。

有用性-繁殖

成熟胚は大量繁殖およびクローニングのために使用し得る。これは、胚を発芽させそして小植物体を土壌に、その他の生長基質またはその他の植物生長環境のいずれかに移植することを必要とする。成熟胚はまた人工種子被膜に包まれ、そして「体細胞種子」として植えられても

良い。雑種の莖または雑種自体を大量製造する必要がある場合に、大量繁殖およびクローニングは有益である。

新規な特徴が遺伝的変更の結果として存在するかどうかを決定するために、上記の段階の間のあらゆる時に、細胞、前胚、胚、小植物体および植物体を分析し得る。特徴は試験管内または植物の特徴において有用であって良い。有用な特徴のいくつかの例は、植物毒素耐性、乾燥耐性、冷寒耐性、疾病耐性その他を包含する。

工程(a)、(b)および(c)の細胞はまた、望ましい特性、例えば除草剤耐性を有する細胞または植物体を産生することができる組織培養法を行っても良い。そのような方法のいくつかの例は、例えばシャレッフおよびレイ(Chaleff and Ray)(1984年)を包含する。

それ故に本発明はまた、生存しているワタ植物体、Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドをコード化し、そして発現するキメラ遺伝子を含む細胞も包含する。

本発明の植物細胞はキメラ遺伝子を含み、そしてBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドを製造するために使用し得る。植物細胞それ自体殺虫剤を構成し得る。殺虫剤として直接使用される植物細胞は培養された植物細胞であっても、また生存している植物の部分であって良い。

毒素は植物細胞から公知の方法、例えば抽出またはクロマトグラフィーにより分離され得る。抽出物は全体の植物細胞抽出物であっても、また部分的に精製された抽出物であっても良く、またポリペプチドの純粋精製物であっても良い。あらゆるそのような抽出物またはクロマトグラフ分離物がBtからの結晶タンパク質として同様の方法で使用し得る（例えばデーコン（Deacon）、1983年、ミラー（Miller）等、1983年参照）。

本発明の殺虫性細胞は、ワタ細胞および植物体を攻撃する昆虫に対して毒性である。

従って、本発明は(a)遺伝子のプロモーター、5'非翻訳領域および場合によっては3'非翻訳領

域により該幼虫を殺す方法も提供する。

植物細胞は培養された植物細胞であっても、また生存している植物体の部分であっても良い。

さらに本発明は、種子が挿入されたキメラ遺伝子およびそれらから生じる望ましい特徴を有する限り、本発明に従って遺伝子操作された植物体のワタ種子を含む。有性および無性の後代を含む本発明の方法により製造された植物体の後代は、その他の実施態様である。有性の後代は自家授粉または他家授粉から生じ得る。

域が植物または植物ウイルス遺伝子から誘導され、Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドをコードする遺伝子をワタの細胞に導入し、そして

(b) 前記ポリペプチドを発現させることからなる、Bt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドをワタ内に産生する方法を提供する。

本発明はまた、Bt結晶毒素またはBt結晶タンパク質の昆虫毒性を実質的に有するポリペプチドをコードする遺伝子を含有する遺伝子導入ワタ細胞の殺虫量を幼虫に与えることからなる昆虫の幼虫を防除する方法も提供する。

本発明はまた、本発明のキメラ遺伝子を含む遺伝子導入ワタ植物細胞の殺虫量を幼虫に与えることからなる該幼虫を殺すまたは防除する方法も含む。さらに、本発明はまたBtテネブリオニス変種結晶毒素またはそれらの殺虫性部分のコード配列を有するキメラ遺伝子を含有する細胞の殺虫有効量を甲虫目の幼虫に与えること

〔実施例および発明の効果〕

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

一般的な組換えDNA法

本発明において用いられる組換えDNA法の多くは当該分野の熟練者にとって決まりきったものである。これらの普通に用いられる方法の簡潔な記載はそれらが以下に示す各々の事実におけるよりもむしろここに含められる。記載したものを除いて、これらの決まりきった操作の全てはマニアチス（Maniatis）等（1982年）による参考文献内に記載されている。

A. 制限エンドヌクレアーゼ消化

典型的には、DNAを反応混合物内に約50-500μg/mlで、マサチューセツ、ビバリーのニューイングランドバイオラプス（New England Biolabs）社により推奨される緩衝液中に入れる。制限エンドヌクレアーゼ2-5単位をDNA1μgにつき添加し、そして反応混合物を前記の会社により推奨される温度で1ないし3時間培養す

る。65℃で10分間加熱するかまたはフェノールでの抽出により反応を終結させ、エタノールでDNAを沈殿させる。この方法はマニアチス等の文献の第104-106頁にも記載されている。

B. フラッシュ末端 (flush end) を製造するためのDNAのポリメラーゼでの処理

DNA断片を反応混合物に50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、ニューイングランドバイオラプス社により推奨される緩衝液中に添加する。反応混合物は全ての4種のデオキシヌクレオチドトリホスフェートを0.2mMの濃度で含有する。反応は15℃で30分間培養され、そして次に65℃に10分間加熱することにより終結される。5'-突出末端を製造する制限エンドヌクレアーゼ例えばEcoRIおよびBamHIでの消化により製造される断片のためには、DNAポリメラーゼの大断片またはクレンロー (Klenow) 断片が使用される。3'-突出末端を製造するエンドヌクレアーゼ例えばPstIおよびSacIにより製造される断片のためには、T4 DNAポリメラーゼが使用される。

この方法はマニアチス等の文献の第170頁に記載されたものとはわずかに異っている。

D. DNA末端への合成リンカー断片の付加

DNA分子の末端への新規な制限エンドヌクレアーゼ部位を添加することが望ましい場合、上記文献に記載されているように、この分子をまずDNAポリメラーゼで処理しフラッシュ末端を製造する。この断片約0.1-1.0 μg を、ニューイングランドバイオラプスから得られるホスホリル化リンカーDNA約100 ngに、ニューイングランドバイオラプスからのT4 DNAリガーゼ2 μl および前記の会社により推奨される緩衝液中の1mM ATPを含有する20-30 μl 容量中で添加する。15℃で一晩培養後、混合物を65℃で10分間加熱することにより反応を終結させる。反応混合物を次に、合成リンカー配列で切断する制限エンドヌクレアーゼに適當な緩衝液中に約100 μl に希釈し、そしてこのエンドヌクレアーゼ約50-200単位を添加する。混合物を適温で2-6時間培養し、次に断片をアガロ-

これらの2つの酵素の使用はマニアチス等の文献の第113-121頁に記載されている。

C. アガロースゲル電気泳動およびゲルからDNA断片の精製

アガロースゲル電気泳動をマニアチス等の文献の第150-163頁に記載のように水平型装置で行なう。使用される緩衝液はその中に記載されているトリス-硼酸塩緩衝液である。DNA断片は電気泳動の間にゲルおよびタンク緩衝液に存在するか、または電気泳動に続いて添加されたいずれかの0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 臭化エチジウムでの染色により視覚化する。DNAを短波長または長波長の紫外線の照射により視覚化する。断片をゲルから分離する場合には、使用されるアガロースは低いゲル化温度のものであり、これはミズーリセントルイスのシグマケミカル (Sigma chemical) から得られる。電気泳動後、望ましい断片を削り取り、プラスチック管内に入れ、約15分間65℃に加熱し、次いでフェノールで3度抽出し、エタノールで2度沈殿させる。

スゲル電気泳動に供し、そして上記のように断片を精製する。生成した断片は今では、制限エンドヌクレアーゼでの消化により製造された終端を有する末端を有するであろう。これらの末端は通常粘着性であり、その結果、生成した断片は今では同じような粘着端を有するその他の断片に容易に連結される。

E. DNA断片からの5'末端のホスフェートの除去

プラスミドクローニング工程の間に、ベクタープラスミドのホスファターゼでの処理は、ベクターの再循環化を減少させる (マニアチス等の文献の第15頁に記載されている)。適當な制限エンドヌクレアーゼでDNAを消化した後、インディアナ州、インディアナポリスのペーリンガー-マンハイム (Boehringer-Mannheim) から得られる仔ウシ消化管のアルカリホスファターゼ1単位を添加する。DNAを37℃で1時間培養し、そして次いでフェノールで2度抽出し、そしてエタノールで沈殿させる。

F. DNA断片の連結

相補的な付着端を有する断片を結合させる場合、各々の断片約100 ngは、ニュイングランドバイオラプスからのT4 DNAリガーゼ約0.2単位をこの会社により推奨される緩衝液中に含有する20-40 μ lの反応混合物中で培養される。培養は15℃で1-20時間行なり。フラッシュ末端を有するDNA断片が結合される場合、それらはT4 DNAリガーゼの量を2-4単位に増加させる以外は上記と同様に培養される。

G. DNAの大腸菌内への形質転換

大腸菌HB101株が多くの実験に使用されている。マニアチス等の文献の第250-251頁に記載されている塩化カルシウム法を用いてDNAを大腸菌内に導入する。形質転換された細菌は、適当な抗生物質を含有する培地上で選択的に増殖し得る。この選択的な能力は、所選の細菌と、形質転換するDNAを収容しない宿主細菌と区別することを可能とする。入ってくる形質転換するDNA上に存在する薬剤耐性遺伝子および宿主遺伝子の薬剤感受性に関する知識が与えられて

おり、どんな抗生物質が適当であるかを決定することは通常のことである。例えば、宿主細菌がアンピシリンに対し感受性であると公知であり、そして入ってくる形質転換するDNA上にアンピシリンに対する機能的な薬剤耐性遺伝子がある場合、アンピシリンは形質転換体の選択にとって適当な抗生物質である。

H. プラスミドのための大腸菌のスクリーニング

形質転換に続いて、大腸菌の生成したコロニーを、クイックプラスミド(quick plasmid)分離法により所望のプラスミドの存在を求めてスクリーニングする。2種の慣用の方法はマニアチス等の文献の第366-369頁に記載されている。

I. プラスミドDNAの大規模な分離

大腸菌内の大量のプラスミドを分離するための方法は、マニアチス等の文献の第88-94頁に見い出される。

J. M13 ファージベクター内へのクローニング

以下の記載において、ファージM13誘導体の二重鎖複製型分子は決まりきった操作例えば制限エンドヌクレアーゼ消化、連結、その他のために用いられることが理解される。

実施例1: プラスミドpBR322内のカメラ遺伝子の製造

CaMV 遺伝子VIプロモーターおよびプロトキシシンコード配列を融合するために、ファージベクターmp19の誘導体[ヤニッシュ-ペロン(Yanish-Perron)等、(1985年)]を製造する。

まず最初に、約155ヌクレオチドの5'ないしプロトキシシンコード領域および隣接する約1346ヌクレオチドのコード配列を含むDNA断片をmp19内に挿入する。ファージmp19 dsrf(二重鎖複製型分子)DNAを、制限エンドヌクレアーゼSac IとSma Iで消化し、そして約7.2 kbp(キロ塩基対)ベクター断片を、標準法により低いゲル化温度のアガロースを通す電気泳動の後に精製する。プロトキシシン遺伝子を含

む約10KbpのB1 DNAを含有するプラスミドpKU25/4をスイス国バーゼル市のチバーガイギーのヨット・ニュエシュ(J. Nüesch)博士から得る。プラスミドpKU25/4に存在するプロトキシシン遺伝子のヌクレオチド配列は式(I)に示されている。プラスミドpKU25/4 DNAをエンドヌクレアーゼHpa IとSai Iで消化し、そして1503 bp断片(式(I)で表わされる配列においてヌクレオチド2~1505を含む)を上記のように精製する(この断片は約155bpの細菌のプロモーター配列および約1346bpのプロトキシシンコード配列の始まりを含む)。各断片約100 ngを次に混合し、T4 DNAリガーゼを添加し、そして15℃で一晩培養する。生成した混合物を大腸菌HB101株内に形質転換させ、インジケーター細菌の大腸菌JM101と混合し、そしてプレーティングする[メッシング(Messing)1983年] mp19/b1と呼ばれる1つのファージを以下の他の製造のために使用する。

次にCaMV 遺伝子VIプロモーターおよび遺伝

子Ⅳのコード配列のいくつかを含むDNA断片を、mp19/bt 内に挿入する。ファージmp19/bt dsrf DNAをBamHⅠで消化し、DNAポリメラーゼの大断片で処理してフラッシュ末端を製造し、そしてエンドヌクレアーゼPstⅠで再び切断する。より大きなベクター断片を上記の電気泳動により精製する。プラスミドpABDⅠはパスコウスキ(Paszowski)等1984年に記載されている。プラスミドpABDⅠDNAをPstⅠとHindⅢで消化する。CaMV遺伝子Ⅳプロモーターおよび約75bpの遺伝子Ⅳコード配列を含む約465bpの長さの断片を精製する。2つの断片を連結し、そして上記のようにプレーティングする。mp19/btca と呼ばれる生成した組換えファージの1つを以下の実験に使用する。

ファージmp19/btcaは、CaMV遺伝子Ⅳプロモーター配列、遺伝子Ⅳコード配列の一部、プロトキシンコード配列の上流のBt DNAの約155bp およびプロトキシンコード配列約1346bpを含む。CaMVプロモーター配列をプ

てまで徐々に冷却する。次に、緩衝液、ヌクレオチドトリホスフェート、ATP、T4DNAリガーゼおよびDNAポリメラーゼの大断片を添加し、そして15℃で一晩培養する(ゾラーおよびスミス、1983年)。アガロースゲル電気泳動の後、環状二重鎖DNAを精製し、そして大腸菌JM101株にトランスフェクションさせる。生成したブランクは、32p-標識オリゴヌクレオチドと雑種形成する配列のためにスクリーニングされ、そしてファージをDNA制限エンドヌクレアーゼ分析により分析する。生成したファージクローンの中に、CaMV遺伝子Ⅳプロモーターとプロトキシンコード配列との間の望ましくない配列を正確に欠失させたものがある。このファージをmp19/btca/debと呼ぶ(第2図参照)。

次に、プロトキシン遺伝子の3'コード領域をCaMV転写終結信号に融合させたプラスミドを製造する。最初にプラスミドpABDⅠDNAをエンドヌクレアーゼBamHⅠとBgⅢとで消化し、そしてCaMV転写終結配列を含む0.5 kbp断片を

ロトキシンコード配列に正確に融合するために、介在DNAをmp19/btca DNAのオリゴヌクレオチド関連の突然変異誘発を使用して切失させる。配列(5') TTCGGATTGTTATCCATGGTTGGAGGTCTGA(3')を有するDNAオリゴヌクレオチドを、アプライドバイオシステムズDNAシンセサイザー(Applied Biosystems DNA Synthesizer)を用いて決まった方法で合成する。このオリゴヌクレオチドは、ファージmp19/btca DNA内の配列に対して、CaMVプロモーターの3'末端[ホーン(Hohn)等、1982年におけるヌクレオチド5762ないし5778]とプロトキシンコード配列の始まり(上記式Ⅱにおけるヌクレオチド156ないし172)で相補的である。突然変異誘発の一般的な方法はゾラーおよびスミス(Zoller and Smith)(1983年)に記載されている。一本鎖ファージmp19/btca DNA約5 μgを40 μgの容量中ホスホリル化オリゴヌクレオチド0.3 μgと混合する。混合物を5分間65℃まで加熱し、50℃に冷却し、そして4

分離する。次に、プラスミドpUC19(ヤニッシュベロン等、1985年)をBamHⅠで消化し、0.5 kbp断片と混合し、そしてT4DNAリガーゼとで培養する。該DNAの大腸菌HB101株内に形質転換の後、生成したクローンの1つ(プラスミドp702と呼ばれる)が得られ、第3図に示される構造を有する。

次にプラスミドp702DNAをエンドヌクレアーゼSacⅠとSmaⅠとで切断し、そしてより大きい約3.2 kbp断片をゲル電気泳動により分離する。プラスミドpKU25/4 DNAをエンドヌクレアーゼAbaⅢとSacⅠで消化し、そしてプロトキシンコード配列の3'部位(式Ⅱで表わされる配列のヌクレオチド1504ないし3773位)を含む2.3 kbp断片(式Ⅱで表わされるヌクレオチド1502ないし3773位)をゲル電気泳動後に分離する。これら2つのDNA断片を混合し、T4DNAリガーゼと培養し、そして大腸菌HB101株内に形質転換する。生成したプラスミドはp702/btである(第3図参照)。

最終的に、ファージ mp19/btca/deb dsrf DNAの一部とプラスミド p702/bt を結合し、CaMV プロモーターおよび終結配列が両側に連結した完全プロトキシンコード配列を含むプラスミドを製造する。ファージ mp19/btca/deb DNA をエンドヌクレアーゼ Sac I と Sph I で消化し、そして約 1.75 kbp の断片を次のアガロースゲル電気泳動により精製する。同様に、プラスミド p702/bt DNA をエンドヌクレアーゼ Sac I と Sma I で消化し、そして約 2.5 kbp の断片を分離する。最後にプラスミド pBR322 DNA (ボリバー (Bolivar) 等、1977年) を Sma I と Sph I とで消化し、そしてより大きな 4.2 kbp 断片を分離する。全ての3種の DNA 断片を混合し、そして T4 DNA リガーゼと培養し、そして大腸菌 HB101 株内に形質転換する。生成したプラスミド、pBR322/bt 14 は、Bt 結晶タンパク質コード配列に融合した CaMV 遺伝子 M プロモーターおよび翻訳開始信号を含み、CaMV 転写終結信号が続く、pBR322 の誘導体である

252 内の非反復 EcoR I 部位を Bgl II 部位に置換することによる変更も行う (これらの変更の要約は第 5 図参照)。プラスミド pRK252 をメガエンドヌクレアーゼ Sma I と Sma I とで消化し、次に DNA ポリメラーゼ I の大断片と処理してフラッシュ末端を製造し、そして大きなベクター断片をアガロースゲル電気泳動により精製する。次に、約 1050 bp の BamHI 断片上に Tn903 を含有するプラスミド p368 をエンドヌクレアーゼ BamHI で消化し、DNA ポリメラーゼの大断片と処理し、そして約 1050 bp の断片をアガロースゲル電気泳動の後分離する；この断片は抗生物質カナマイシンに対して耐性を与えるトランスポゾン Tn903 からの遺伝子を含む (オカ等、1981年)。両方の断片を次に DNA ポリメラーゼの大断片と処理し、フラッシュ末端を製造する。両方の断片を混合し、そして T4 DNA リガーゼと 15℃ で一晩培養する。大腸菌 HB101 株内への形質転換およびカナマイシン耐性コロニーの選択後、プラスミド pRK

(第 4 図参照)。

実施例 2 : Ti プラスミド誘導ベクターの製造

ベクター pCIB10 (ロススタイン等、1987年) は、アグロバクテリウム チュメファシエンスを介して植物体へキメラ遺伝子の転移に有用な Ti プラスミド誘導ベクターである。ベクターは、ミズーリ、ワシントン大学のダブリュ・バーンズ (W. Barnes) 博士から入手し得る広い宿主範囲のプラスミド pRK252 から誘導される。ベクターはまた、Tn903 からのアグロバクテリウム中のカナマイシン耐性の遺伝子 (オカ等、1981年) および Ti プラスミド pTi T37 からの左右の T-DNA 境界配列も含む。境界配列の間には、プラスミド pUC18 からのポリリンカー領域および植物体にカナマイシン耐性を与えるキメラ遺伝子がある。

まず最初に、プラスミド pRK252 を変異し、テトラサイクリン耐性に関する遺伝子をトランスポゾン Tn903 からのカナマイシンに対する耐性に関する遺伝子に置換し、そしてまた pRK

252/Tn903 が得られる (第 5 図参照)。

プラスミド pRK252/Tn903 をその非反復 EcoR I 部位で消化し、続いて大腸菌 DNA ポリメラーゼの大断片と処理し、フラッシュ末端を製造する。この断片を合成 Bgl II 制限部位リンカーに添加し、そして T4 DNA リガーゼと一晩培養する。生成した DNA を過剰の Bgl II 制限エンドヌクレアーゼで消化し、そして大きなベクター断片をアガロースゲル電気泳動により精製する。生成した断片を T4 DNA リガーゼと再び培養してその新規に添加された Bgl II 粘着端を介して該断片を再循環化する。大腸菌 HB101 株内への形質転換に続いて、プラスミド pRK252/Tn903/Bgl II が得られる (第 5 図参照)。

Ti プラスミド T-DNA 境界、プラスミド pUC19 のポリリンカー領域および植物体においてカナマイシン耐性の選択可能な遺伝子を含むプラスミド pBR322 の誘導体を製造する (第 6 図参照)。プラスミド pBR325/Eco29 はノベリン Ti プラスミド pTi T37 からの 1.5

kbp の EcoRI 断片を含有する。この断片は T-DNA 左側境界配列を含む [ヤダブ (Yadav) 等、1982 年]。この断片の EcoRI 末端を Hind III 末端と置換するために、プラスミド pBR325/Eco29 DNA を EcoRI で消化し、次いでヌクレアーゼ S1 と培養し、続いて DNA ポリメラーゼの大断片と培養してフラッシュ末端を製造し、次に合成 Hind III リンカーと混合し、そして T4 DNA リガーゼと培養する。生成した DNA をエンドヌクレアーゼ ClaI および過剰の Hind III で消化し、そして生成する T-DNA 左側境界を含む 1.1 kbp の断片をゲル電気泳動により精製する。次に、エンドヌクレアーゼ EcoRI および Hind III でのプラスミド DNA の消化によりプラスミド pUC19 のポリリンカー領域を分離し、そしてより小さい断片 (約 53 bp) をアガロースゲル電気泳動により分離する。次に、プラスミド pBR322 をエンドヌクレアーゼ EcoRI および ClaI で消化し、その他の 2 つの分離された断片と混合し、T4 DNA リガーゼと培養し、そして大

腸菌 HB101 株内に形質転換する。生成するプラスミド pCIB5 は、プラスミド pBR322 内にポリリンカーおよび T-DNA 左側境界を含む (第 6 図参照)。

植物体内にカナマイシン耐性を発現するための遺伝子を含有するプラスミドが製造される (第 7 および 8 図参照)。プラスミド pBIN6 は、英国、ケンブリッジにある植物育種研究所 (Plant Breeding Institute) のエム・ベバン (M. Bevan) 博士から入手される。このプラスミドはベバンによる文献 (1984 年) に記載されている。プラスミド pBIN6 DNA を EcoRI および Hind III で消化し、そしてキメラネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT) 遺伝子を含有する約 1.5 kbp の大きさの断片を分離し、そして引き続きアガロースゲル電気泳動で精製する。この断片を次に、エンドヌクレアーゼ EcoRI と Hind III で切断したプラスミド pUC18 DNA と混合する。T4 DNA リガーゼとの培養に引き続き、生成する DNA を大腸菌 HB101

株内に形質転換する。生成するプラスミドを pUC18/neo と呼ぶ。このプラスミド DNA はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子とノバリンシンターゼ遺伝子の終結配列との間に望ましくない BamHI 認識配列を含有する (ベバン、1984 年参照)。この認識配列を除去するために、プラスミド pUC18/neo をエンドヌクレアーゼ BamHI で消化し、続いて DNA ポリメラーゼの大断片との処理によりフラッシュ末端を製造する。断片を次に T4 DNA リガーゼと培養して断片を再循環化させ、そして大腸菌 HB101 株内に形質転換する。生成するプラスミド、pUC18/neo (Bam) は BamHI 認識配列を失っている。

次いで T-DNA 右側境界配列をキメラ NPT 遺伝子の次に添加する (第 8 図参照)。プラスミド pBR325/Hind23 はプラスミド pTiT37 の 3.4 kbp の Hind III 断片を含有する。この断片は右側 T-DNA 境界配列を含有する (ベバン等、1983 年)。プラスミド pBR325/Hind23 DNA

をエンドヌクレアーゼ SacII と Hind III で切断し、そして右側境界を含有する 1.0 kbp 断片を引き続くアガロースゲル電気泳動で分離し、そして精製する。プラスミド pUC18/neo (Bam) DNA をエンドヌクレアーゼ SacII と Hind III で消化し、そしてアガロースゲル電気泳動により 4.0 kbp のベクター断片を分離する。2 つの断片を混合し、T4 DNA リガーゼと培養し、そして大腸菌 HB101 株内に形質転換する。生成するプラスミド、pCIB4 (第 8 図に示す) は、T-DNA 右側境界およびプラスミド pUC18 の誘導体中のカナマイシン耐性に対する植物選択可能なマーカーを含有する。

次に、両境界の間の植物選択可能なカナマイシン耐性遺伝子および pUC18 のポリリンカーと共に、T-DNA 左右両側境界を含有するプラスミドを製造する (第 9 図に示す)。プラスミド pCIB4 DNA をエンドヌクレアーゼ Hind III で消化し、続いて DNA ポリメラーゼの大断片と処理してフラッシュ末端を製造し、続いてエンドヌク

レアーゼEcoRIで消化する。カメラカナマイシン耐性遺伝子およびT-DNAの右側境界を含有する2.6 kbp断片をアガロースゲル電気泳動により分離する。

プラスミドpCIB DNAをエンドヌクレアーゼAatIで消化し、T4DNAポリメラーゼと処理してフラッシュ末端を製造し、次いでエンドヌクレアーゼEcoRIで切断する。より大きいベクター断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、pCIB4断片と混合し、T4DNAリガーゼと培養し、そして大腸菌HB101株内に形質転換する。

生成するプラスミド、pCIB (第9図に示す)は、2つのT-DNA境界の間に所望の配列を含有するプラスミドpBR322の誘導体である。

引き続き工程はベクターpCIB10の構成を完了し、そして第10図に示される。プラスミドpCIB2 DNAをエンドヌクレアーゼEcoRVで消化し、そしてBglII認識部位を含有する合成リンカーを上記のように添加する。過剰のBglII

HB101株内への形質転換の後に、プラスミドpCIB10/19Sbtを得る(第11図参照)。このプラスミドは、プラスミドベクターpCIB10内にカメラプロトキシンを含有する。

大腸菌HB101からアグロバクテリウムへプラスミドpCIB10/19Sbtを転移させるために、介在大腸菌宿主S17-1株[サイモン(Simon)等、1983年]を用いる。この株は、コロラド・ボールダーのアグリジェネティクス・リサーチ(Agrigenetics Research)社から得られ、結合を介してアグロバクテリウムに直接プラスミドpCIB10/19Sbtを移し得る可動機能を含み、アグロバクテリウム内に直接裸のプラスミドDNAを形質転換する必要がない。最初に、プラスミドpCIB10/19Sbt DNAを塩化カルシウム処理S17-1細胞内へ導く。次に、形質転換S17-1細胞およびアグロバクテリウム・デュメファシエンズLBA4404株[オームズ(Ooms)等、1982年]の培養液を混合し、そしてNアガー(ディフコ)プレート上、室温で一晩交配

エンドヌクレアーゼでの消化の後に、アガロースゲル電気泳動の後に約2.6 kbpの断片を分離する。上記のプラスミドpRK252/Tn903/BglIIをエンドヌクレアーゼBglIIで消化し、そして次にホスファターゼと処理して再循環化を防止する。これら2つのDNA断片を混合し、T4DNAリガーゼと培養し、そして大腸菌HB101株内に形質転換する。生成するプラスミドは完成されたベクター、pCIB10である。

実施例3: ベクターpCIB10内へのカメラプロトキシン遺伝子の挿入

以下の工程を第11図に示す。プラスミドpBR322/6t14 DNAをエンドヌクレアーゼPvuIとSalIで消化し、そして次にエンドヌクレアーゼBamHIで部分的に消化する。カメラ遺伝子を含有する大きさ約4.2 kbpのBamHI-SalI断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、そしてエンドヌクレアーゼBamHIとSalIで消化したプラスミドpCIB10 DNAと混合する。T4DNAリガーゼとの培養および大腸菌

生成する細菌の1ループ量(a Loopful)をAB最小培地上に綿状に塗り[チルトン(Chilton)等、1974年]、50 µg/mlのカナマイシンをプレーティングし、28℃で培養する。コロニーを同一培地上に再び綿状に塗り、次いでN-アガープレート上に再び綿状に塗る。増殖の遅いコロニーを取り出し、カナマイシンを有するAB最小培地上に再び綿状に塗布し、そして単一コロニーを分離する。この操作は、pCIB10/19Sbtプラスミドを含有するアグロバクテリアを選択する。

実施例4: タバコ植物細胞へのカメラ遺伝子の転移

ニコチアナ・タバカム・コーカー176°変種(Nicotiana tabacum CV. "Coker 176°")プロトプラストを以下のように製造する:

4ないし5週齢の苗条培養体を、ホルモンを含有しないMS培地(ムラシゲおよびスカッグ、1962年)中、26℃で、16時間明所/8時間暗所の光時間で無菌的に増殖させる。約1.5 g

の葉組織を植物体から除去し、各々が酵素溶液 10 ml 含有する 8 ないし 10 個のベトリ皿 (100 × 25 mm, ラブ-テック (Lab-Tek)) に等しく分配する。酵素溶液は、1% セルラーゼ R-10 (ヤクルト製薬株式会社製)、0.25% マセラーゼ [カルビオケム (Calbiochem) 社製]、1% ペクトリナーゼ Y-23 [セイシン (Seishin) 製薬株式会社製]、0.45 M マンニトールおよび 0.1 × K₃ 塩 [ナギーおよびマリガ (Nagy and Maliga), 1976 年] を含有する。タバコの葉を外科用メスで薄い細片に切り、皿を密封し、回転振とう機上に 35 rpm で設置し、そして酵素と室温で 4 ないし 5 時間培養する。

次に、皿の内容物を、チーズクロス貼りロートを通して濾過し、そしてフラスコ内に集める。各々すすぎ溶液 3.5 ml を含有するバブコックフラスコ内に伊液をビペットで取る。[すすぎ溶液は 0.45 M シェ糖、MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、および 0.1 × K₃ 塩を含有する。] ボトルを 80 × g で 10 分間遠心分離し、

その後プロトプラストはボトルの表面に浮上する。プロトプラストを 1 ml ビペットで除き、1本のボトルに集め、そしてさらに 2 度すすぐ。生成するプロトプラストを 1.5 ml の使い捨て遠心管内の K₃ 培地中に懸濁する。

プロトプラストの濃度を、フックス-ローゼンタール (Fuchs-Rosenthal) の血球計数器内で計測することにより決定する。プロトプラストを次に、100 × 20 mm ベトリ皿 [コーニング (Corning)] 当たり液体 K₃ 培地 6 ml 中に 100,000/ml の濃度でプレーティングする。プロトプラストを含有する皿を暗所で 2 日間 26℃ で培養し、その間に細胞壁再生が起こるのである。

2 日間の培養後、pCIB 10/19 Sbt 含有のアグロバクテリウム チュメファシエンスの固定培養液 5 μl をプロトプラストの皿に添加する。(固定相に達するまでアグロバクテリアを 50 μg/ml カナマイシン添加 YEP 培地中で増殖させる。) さらに 26℃ で 3 日間の培養後、アグロ

バクテリアを殺すためにセフォタキシム (cefotaxime) (カルビオケム社) を添加する (500 μg/ml)。次の日、細胞を 1 皿当たり新鮮な K₃ 培地 3 ml で希釈し、そしてセフォタキシムを再び添加する (500 μg/ml)。次いで細胞を 26℃ で 2 ないし 3 週間増殖させ、そして次にデブロック (DeBlock) 等 (1984 年) により記載される選択培地上でスクリーニングする。

実施例 5: CaMV 35S プロモーターを有する Bt プロトキシンキメラ遺伝子の製造

5.1 CaMV 35S プロモーターカセット (cassette) の製造

プラスミド pCIB710 を第 12 図に示すように製造する。このプラスミドは 35S RNA 転写のための CaMV プロモーターおよび転写終結配列を含む [コベイ (Covey) 等, 1981 年]。

CaMV DNA の 1149 bp の Bgl II 制限断片 [ホーン等 (1982 年) により記載されている bp 6494-7645] を、プラスミド pLV111 (サンジェゴ、カリフォルニア大学のエス・ホークエ

ル博士から得られる) から分離する。また、その断片は CaMV DNA から上記の調製アガロースゲルにより直接分離し得、そして BamHI-開裂プラスミド pUC19 DNA と混合し、T4DNA リガーゼとで処理し、そして大腸菌内で形質転換させる [生成したプラスミドの BamHI 部位は Bgl II 粘着端の BamHI 粘着端への連結により破壊されたことに注意]。生成したプラスミドを pUC19/35S と呼び、これを次のオリゴヌクレオチド-関連の試験管内での突然変異誘発において使用し、BamHI 認識配列 GGATCC、同時に続くホーンの文献の CaMV スクレオチド 7483 を挿入する。生成したプラスミド pCIB710 は CaMV35S プロモーター領域および BamHI 認識部位により分離された転写終結領域を含む。この BamHI 部位内に挿入された DNA 配列は、これらの CaMV 転写調節配列により植物体内に表現されるであろう (pCIB710 は転写の開始部位と BamHI 部位との間に ATG 翻訳開始コンドを含有していないことに注意)。

5.2 CaMV35S プロモーター/ターミネーター カセットの pCIB10 内への挿入

下記工程は第13図に概略的に示す。

プラスミド pCIB10 および pCIBDNA を EcoR I と Sma I で消化、混合および連結する。生成したプラスミド、pCIB10/710 は植物形質転換ベクター pCIB10 内に挿入された CaMV35S プロモーター/ターミネーターカセットを有する。CaMV35S 配列は pCIB10 の T-DNA 境界の間にあり、そしてこうして植物形質転換実験物内の植物ゲノム内に挿入されるであろう。

5.3 Bt プロトキシン遺伝子の pCIB10/710 内への挿入

下記工程は第14図に概略的に示す。

プロトキシン遺伝子の源として、プラスミド pCIB10/19S b1 を BamH I と Nco I で消化し、そしてプロトキシン遺伝子を含む 6 kb の断片を調整ゲル電気泳動により分離する。断片を次に配列 5'-CATGGCCGGATCCGGC-3' を有す

る合成 Nco I-BamH I アダプターと混合し、次に BamH I で消化する。この工程はプロトキシン断片の両末端で BamH I 粘着端を形成する。この断片を次に BamH I-開裂 pCIB10/710 内に挿入する。生成したプラスミド、第14図に示す pCIB10/35S b1 は CaMV35S プロモーターと転写終結配列の間にプロトキシン遺伝子を含む。

5.4 植物形質転換のためのアグロバクテリウム チュメファシエンヌ内へのプラスミド pCIB10/35S b1 の転移

プラスミド pCIB10/35S b1 をアグロバクテリウム チュメファシエンヌ LBA4404 株内に上記実施例4に記載したように転移させる。

実施例6：Bt テネブリオニス変種の殺虫性毒素 遺伝子をコード化するキメラ遺伝子 を含む pTOX の製造

Bt テネブリオニス変種の殺虫性結晶タンパク質をコード化する遺伝子は同定されそして配列決定されている [セカー (Sekar) 等 (1987年)]。

このコード配列は慣用の制限断片、例えば約 3 kb の大きさの Hind III 断片に分離され、そして適当な植物発現ベクター、例えばプラスミド pCIB770 (ロススタイ等, 1987年) 内に挿入される。プラスミド pCIB770 は植物体内での発現のためのキメラカナマイシン遺伝子並びに非反復 BamH I 部位により分離された CaMV の 35SRNA 転写のプロモーターおよびターミネーターを含む。毒素コード配列を生ずる制限断片は適当な分子アダプターの使用により pCIB770 の非反復 BamH I 部位に適合されており、そして一緒に連結される。

実施例7：Bt サンジェゴ株の殺虫性毒素遺伝子 をコード化するキメラ遺伝子を含む pSAN の製造

Bt サンジェゴ株の殺虫性結晶タンパク質をコード化する遺伝子はヘルンスタット (Herrnstadt) 等, EP-0-202-739 号および EP-0-213-818 号により同定されそして配列決定されている。このコード配列は慣用の制限断片に分離され、

そして適当な植物発現ベクター、例えば pCIB770 内に挿入される。プラスミド pCIB770 は植物体内での発現のためのキメラカナマイシン遺伝子並びに非反復 BamH I 部位により分離された CaMV の 35SRNA 転写のプロモーターおよびターミネーターを含む。毒素コード配列を生ずる制限断片は適当な分子アダプターの使用により pCIB770 の非反復 BamH I 部位に適合されており、そして一緒に連結される。

実施例8：約725個のアミノ酸のポリペプチド をエンコードする欠失Btプロトキシン 遺伝子の製造、およびこの欠失遺 伝子をCaMV35Sプロモーターと共 に含有するキメラ遺伝子の製造

約725個のアミノ酸のポリペプチドをコード化する欠失プロトキシン遺伝子は、式(II)に示した配列における2525位のKpn I 制限エンドヌクレアーゼ部位で切断することにより遺伝子の COOH 末端部分を除去することにより作られる。プラスミド pCIB10/35S b1 (第14図) を

BamHIとKpnIで消化し、そして欠失プロトキシソ遺伝子を含む約2.2 kbpのBamHI/KpnI断片を調製アガロースゲル電気泳動により分離する。3'末端のKpnI部位をBamHI部位に変換するために、断片をKpnI/BamHIアダプターオリゴヌクレオチドと混合し、連結する。この断片を次にBamHI-切断pCIB10/710(第13図)と混合する。生成する形質転換体は、pCIB10/35Sbt(KpnI)と交わされ、そして第15図に示され、約725個のアミノ酸のポリペプチドをコード化する欠失プロトキシソ遺伝子を含む。これらの形質転換体はカナマイシン上で選択される。

実施例9: 約645個のアミノ酸のポリペプチドをエンコードする欠失Btプロトキシソ遺伝子の製造、およびこの欠失遺伝子をCaMV35Sプロモーターと共に含有するキメラ遺伝子の製造

約645個のアミノ酸のポリペプチドをコード化する欠失プロトキシソ遺伝子は、式(II)に示し

た配列における2090位のBclI制限エンドヌクレアーゼ部位で切断することにより遺伝子のCOOH末端部分を除去することにより作られる。

プラスミドpCIB10/35Sbt(第14図)をBamHIとBclIで消化し、そして欠失プロトキシソ遺伝子を含む約1.9 kbpのBamHI/BclI断片を調製アガロースゲル電気泳動により分離する。BclIはBamHIに適合する粘着端を製造するから、この断片をBamHI-切断pCIB10/710(第13図)に連結する前にその他の操作は必要ない。第16図に示される構造を有する生成プラスミドpCIB10/35Sbt(BclI)は、カナマイシン上で選択される。

実施例10: 約607個のアミノ酸のポリペプチドをエンコードする欠失Btプロトキシソ遺伝子の製造、およびこの欠失遺伝子をCaMV35Sプロモーターと共に含有するキメラ遺伝子の製造

欠失プロトキシソ遺伝子は、式(II)に示した配

列におけるヌクレオチド1976の次にBamHI切断片部位(GGATCC)を導入することにより作られる。

これは、pCIB10/35Sbtからのプロトキシソ配列を含有するBamHI断片をmp18内にクローニングし、そして上記の標準オリゴヌクレオチド突然変異誘発法を用いて行われる。突然変異誘発の後、二重鎖複製型DNAをM13から調製し、次いでこれをBamHIで消化する。欠失プロトキシソ遺伝子を含む約1.9 kbpの断片をBamHI-切断pCIB10/710内に挿入する。第17図に示される構造を有する生成プラスミドpCIB10/35Sbt(607)は、カナマイシン上で選択される。

残りの実施例には、ワタ細胞を形質転換させ、そしてワタ細胞およびカルスからワタ植物体を再生させるための特定のプロトコルを記載する。当業者が本発明の範囲内に依然あるプロトコルの詳細を変更し得るということは理解すべきである。例えば、多くの植物組織培養培地は公知

であり、そのうちのいくつかは以下に詳細に記載されている。組織培養に係わる通常の熟練した科学者は、同一または類似の結果を得るために、これらの溶液の変更の仕方を知っているであろう。従って、実施例12は、種子発芽およびカルス増殖培地として改良ホワイット貯蔵溶液を開示し；実施例13はカルス生長/維持培地としてムラングおよびスック貯蔵溶液を記載し；実施例14は植物発芽培地としてビーズレイおよびティンク(Beasley and Ting)貯蔵溶液を記載している。組織培養に係わる通常の熟練した科学者は、実施例に記載した結果と類似した結果を得るためにこれらの溶液の変更の仕方を知っている。従って、カルス生長培地中の糖は、フェノールの分泌を最小限にするグルコース、または胚形成性カルスの形成を促進するショ糖であって良い。

形質転換操作において使用される外植片は、あらゆる適当な供給源、例えば発生、特に子葉もしくは胚軸生長している果実の成熟胚からの

ものであって良い。

アグロバクテリウムに対して毒性をあらゆる抗生物質は、形質転換段階の後に残りのアグロバクテリウムを殺すために使用され得る。セフトキシムが好ましい。

実施例11：ワタ植物体の再生

11.1 培地

本実施例における全ての培地は、ムラシグおよびスック無機塩およびガムボルクB-5ビタミンを含有し、pH5.7に調整され、そして以下の組成(μg/l)を有する：

大量栄養成分

MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440

微量栄養成分

H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · H ₂ O	15.6

4 20g/l シュ糖、0.5mg/lピクロラム

5 20g/l シュ糖、5mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

6 20g/l シュ糖、15mg/lグルタミン

25、28および31℃での培地は、温度に加えて、 $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (=1670ルクス)の光強度で16時間明所、8時間暗所の光期間に関する。

11.2 種子滅菌および植え付け

ワタ(ゴッソビウム ヒルスラム Coker 310変種)の種子を濃H₂SO₄中に2分間入れることによりリントを取り除く。種子を次いで無菌の蒸留水で4回洗浄し、95%エタノール中に浸漬し、火炎処理し、そして31℃で培地1上に植え付ける。

11.3 カルス誘導

植え付けて7日後、発生の胚軸を取り出し、長軸に沿って薄く切り、2mmの切片に切り、そして31℃で培地2上に置く。胚軸切片(2mm)を毎週新鮮な培地2に移し、そしてこれらの培養体もまた31℃に維持する。培地2に対して

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
KI	0.83
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	57.3

ビタミン

チアミン · HCl	10
ピリドキシン · HCl	1
ニコチン酸	1
ミオイノシトール	100

さらに、種々の培地は以下の成分を有する。

培地番号	添加成分
1	20g/l シュ糖、0.4%高級アガー(ディフコ)
2	30g/l グルコース、2mg/l α-ナフトレン酢酸、 1mg/l カイネテン、0.8%高級アガー
3	50g/l シュ糖、2mg/l α-ナフトレン酢酸、 1mg/l カイネテン、0.8%高級アガー

4回の週毎の移し変えに続いて、胚軸切片上に増殖するカルス組織をもとの外植片から除去し、31℃で培地5上に置く。1ヶ月後、カルスを新鮮な培地3に移し、そしてさらに1ないし2ヶ月間維持する。

11.4 懸濁培養開始

懸濁培養の開始のために、カルス組織100mgを125mlデロングフラスコ内の培地4 3.5ml中に入れる。懸濁液を6週間140rpmおよび28℃で回転させるが、その時それらは急激に増殖し始める。

11.5 胚生葉および植物体再生

培地4中に形成する胚は、続いて培地4を培地5に置換することによりさらに速く増殖する。この胚懸濁液を分け、そして3ないし7日毎に新鮮な培地5内に副次培養する。培地5内で増殖する胚の生長のために、胚を培地6で洗浄し、そして次に培地6中に入れる。培地6へ移し変えて3ないし4週後、成熟胚を25℃で固体培地上に置く。固体培地は、KNO₃および

NH_4NO_3 の代わりに 40mM KNO_3 を有する MS 塩、B-5 ビタミン、2 mg シュ糖、15mM グルタミンを含有する改良 MS 培地からなり、そして 0.2 mg グルタイトで固化させた (pH 5.7)。胚を 25℃ でベトリ皿中に置く。苗条生長はこの培地上で散在性であり、そして根の伸長は胚をグルタミン非含有の上記改良 MS 培地に移し変えて増大する。発芽している胚を次に鉢内の土に石に植え付け、ビーカーで覆う (25℃)。小植物体を 3 石に根づかせた後にビーカーを取り除く。小植物体を植物体へさらに生長させるために 28℃ で 1 週間の後、温室内に置く。

実施例 12 : 種子の発芽およびカルス生長培地
〔改良ホワイト (1961 年) 貯蔵液の組成 (参照により本明細書に繰入する)〕

成 分	1000 ml 当たりの濃度	備 考
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.6 g	溶解し、そして最終容量
Na_2SO_4	2.0 g	1000 ml とする。
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.65 g	ホワイト A 貯蔵液とラベルをつける。 最終培地 1 l 当たり 100 ml 使用
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.6 g	溶解し、そして最終容量
KNO_3	800 mg	1000 ml とする。
KCl	450 mg	ホワイト B 貯蔵液とラベルをつける。 最終培地 1 l 当たり 100 ml 使用。
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	溶解し、そして最終容量
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	100 ml とする。
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	300 mg	ホワイト C 貯蔵液とラベルをつける。
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg	最終培地 1 l 当たり 1.0 ml 使用。
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	
H_3BO_3	50 mg	
Fe-EDTA		MSFe EDTA (下記参照) 1 l 当たり 10 ml 使用。

成 分	1000 ml 当たりの濃度	備 考
有機物		MS 有機液 (下記参照) 1 l 当たり 10 ml 使用。
実施例 13 : カルス生長 / 維持培地 〔ムラングおよびスクッグ (MS) (1962 年) 貯蔵液の組成 (参照により本明細書に繰入する)〕		
成 分	貯蔵液 1000 ml 当たりの濃度	備 考
NH_4NO_3	41.26 g	溶解し、そして最終容量
KNO_3	42.50 g	1000 ml とする。
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.00 g	MS - 主溶液とラベルをつける。
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.25 g	最終培地 1 l 当たり 40 ml 使用する。
KH_2PO_4	4.25 g	
KI	83 mg	溶解し、そして最終容量
H_3BO_3	420 mg	1000 ml とする。
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1690 mg	MS - 従溶液とラベルをつける。
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 mg	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	最終培地 1 l 当たり 100 ml 使用する。
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg	

成 分	貯蔵液 1000 ml 当たりの濃度	備 考
ニコチン酸	50 mg	溶解し、そして最終容量
ピリドキシン HCl	50 mg	1000 ml とする。
チアミン HCl	10 mg	MS - 有機液とラベルをつける。 10 ml ずつ凍結。最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。
Fe EDTA	278 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 278 g を
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	375 g	脱イオン化水約 200 ml 中に
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		溶かす。 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (エチレンジアミノ四酢酸二水和物のジナトリウム塩) 375 g をもう一つのビーカーの脱イオン化水 200 ml 中に溶かす。 Na_2EDTA 水溶液をホットプレート上で約 10 分間加熱する。耐えず攪拌しながら、 Na_2EDTA 水溶液に FeSO_4 水溶液を添加する。 室温まで冷やし、容量を 1000 ml とする。

成 分	貯蔵液 1000 ml 当たりの濃度	備 考
		MS Fe-EDTA とラベルをつける。ビンをホイルで包み、冷蔵庫に貯蔵する。 最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。
チアミン HCl	50 mg	溶解し、そして容量を 500 ml とする。 MS-チアミンとラベルする。 最終培地 1 l 当たり 4.0 ml 使用する。
イノシトール	10 g	溶解し、そして最終容量を 1000 ml とする。
グリシン	0.2 g	MS-グリシン/イノシトールとラベルする。 最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。

成 分	1000 ml 当たりの濃度	備 考
KNO ₃	25.275 g	溶解し、そして容量を 200 ml とする。 B & T - D 貯蔵液とラベルする。 最終培地 1 l 当たり 40 ml 使用する。
ニコチン酸	4.92 mg	溶解し、そして容量を 100 ml とする。
ピリドキシン HCl	8.22 mg	B & T - 有機溶液とラベルする。 最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。
チアミン HCl	13.49 mg	MS-Fe-EDTA 1 l 当たり 10 ml 使用する。
Fe-EDTA		最終培地 1 l 当たり 100 mg
イノシトール		最終培地 1 l 当たり 1200.6 mg
NH ₄ NO ₃ (15 M)		

実施例 14 : 植物発芽培地

[ビーズレイおよびティンダ (1973 年) 貯蔵溶液の組成]

成 分	1000 ml 当たりの濃度	備 考
KH ₂ PO ₄	272 g	溶解し、そして容量を 100 ml とする。
H ₃ BO ₃	61.83 mg	B & T - A 貯蔵液とラベルする。 最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	24.2 mg	CaC ₂ · 2 H ₂ O 2.6 g 溶解し、そして容量を 100 ml とする。
		KI 8.3 mg とする。
		CoC ₂ · 6 H ₂ O 0.24 mg B & T - B 貯蔵液とラベルする。 最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	4.93 g	溶解し、そして容量を 100 ml とする。
MnSO ₄ · H ₂ O	16.902 mg	B & T - C 貯蔵液とラベルする。 最終培地 1 l 当たり 10 ml 使用する。
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8.627 mg	
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.25 mg	

実施例 15 : 子葉移植片から出発する植物体の再生

ゴッソビウム ヒルスタムの Acala ワタ蜜種 SJ2 の種子を 95 % アルコールと 5 分間接触させることにより滅菌し、次いで滅菌水で 2 度すすぎ、そして次亜塩素酸ナトリウムの 1.5 % 水溶液に 15 分間浸漬し、次に滅菌水中ですすぐ。滅菌した種子を基礎アガー培地上暗所で約 14 日間発芽させて、実生を産生させる。実生の子葉を 2 ないし 4 mm² の切片に切り、この切片を、0.4 mg/l チアミン-HCl, 30 g/l グリコース 2.0 mg/l ナフタレン酢酸 (NAA), 1 mg/l カイネチン、100 mg/l m-イノシトールおよびアガー (0.8 %) を補足したムランゲおよびスック (MS) 主および従塩溶液からなるカルス誘導培地 (上記参照) に無菌的に移す。約 2000 ないし 4000 ルクス of 光強度を供給する蛍光 (薄色日光) を有するパーシバルインキュベーター (Percival incubator) 中、16 時間明所および 8 時間暗所の条件下約 30°C で培養液を培養す

る。

3 ないし 4 週間以内で培養組織切片上にカルスが形成され、そして色は白ないし灰緑がっている。形成されたカルスを 3 ないし 4 週毎に、100 mg/ℓ m-イノシトール、20 g/ℓ シュロ糖、2 mg/ℓ ナフタレン酢酸 (NAA) およびアガーを含有する MS 培地からなるカルス生長培地上に副次培養する。細胞質胚は、組織外植片をカルス誘導培地上に最初に置いてから 4 ないし 6 ヶ月後に形成される。新鮮なカルス生長培地上に 3 ないし 4 週毎に副次培養することにより、カルスおよび胚をカルス生長培地上に維持する。

組織片上に形成された体細胞胚を、新鮮なカルス生長培地またはビーズレイおよびティンダ培地 (胚発芽培地) のいずれかに外植する。

体細胞胚から形成される体細胞小植物体を、有機窒素源として 1200 mg/ℓ 硝酸アンモニウムおよび 500 mg/ℓ カゼイン水解物を含有するビーズレイおよびティンダ培地上に移す。培地を固化剤 (グルライト) により固化させ、そして

マゼンタボックスに小植物体を置く。

体細胞胚は、約 3 ヶ月以内で小植物体に生長する。小植物体を 6 ないし 8 葉期 [高さ約 7.5 および 10 cm] に根づかせ、そして土壌に移し、そして高湿度下 3 ないし 4 週間インキュベーター中に保持し、その後それらを温室に移す。硬化した後、植物体を屋外の耕した土壌に移す。

実施例 16 : 子葉外植片から出発する植物体の再生 - 変法 1

全ての培地成分を明記した濃度の 1/2 に減らした 1/2 強度 MS 培地を代わりに用いて実施例 15 の操作を繰り返す。実質的に同じ結果が得られた。

実施例 17 : 子葉外植片からの異なるワタ変種の再生

Acala ワタ変種 SJ 4, SJ 2 C-1, GC 510, B 1644, B 2724, B 1810, ピッカー (picker) 変種 Siokra およびストリッパー (stripper) 変種 FC 2017 を用いて実施例 15 および 16 の操作を繰り返す。全てが成功裡に再生した。

実施例 18 : 中間段階として懸濁細胞培養液での子葉移植片からワタ植物体の再生

体細胞胚を形成し得るカルスを得る程度まで実施例 15 の操作を繰り返す。

0.4 mg/ℓ テアミン HCl、20 g/ℓ シュロ糖、100 mg/ℓ m-イノシトールおよびナフタレン酢酸 (2 mg/ℓ) を補足した MS 主および従塩溶液からなる液体懸濁培養培地 8 ml 単位中に T 型管内で、活発に生長する胚形成カルスの片約 750 ないし 1000 mg を懸濁し、そして 16:8 = 明所:暗所の一定の型の下、1.5 rpm で回転する回転ドラム上に設置する。約 2000 ないし 4500 ルクスの光強度が蛍光 (寒色日光) により再び供給される。

4 週間の後、懸濁液を 840 ミクロンの大きさのナイロンメッシュを通して濾過し、より大きな細胞塊を除去する。840 ミクロン以下の面分を沈澱させ、新鮮な懸濁培養培地約 20 ないし 25 ml で 1 度洗浄するこの細胞懸濁液を T

型管に移し (管当たり 2 ml) そして各管を新鮮な懸濁培養培地 6 ml で希釈する。上記操作を 10 ないし 12 日間隔で繰り返すことにより培養体を維持する。各副次培養時、懸濁液を濾過し、そして 840 ミクロン以下の細胞集合体を含有する面分を新鮮な懸濁培養培地に移す。全ての場合において、840 ミクロン以上の細胞塊を含有する面分をカルス生長培地上に置き、成熟体細胞胚を得る。

カルス生長培地上に形成されて体細胞胚を除去し、そして胚発芽培地に移す。実施例 15 のプロトコルを用いて、これを発芽させ、小植物体そして次に農園で生長する植物体に生長させる。

実施例 19 : 中間段階として懸濁細胞培養液での子葉移植片からワタ植物体の再生 - 変法 1

胚形成性カルス 750 ないし 1000 mg を 2 mg/ℓ NAA 含有の MS 液体培地 15 ないし 20 ml を含有するデロングフラスコに移すことにより

懸濁培養液を形成することを除いて実施例 18 の操作を繰り返す。培養液含有フラスコを回転振とう機上に設置し、そして 100 ないし 110 ストローク/分で振とうする。3 週間後懸濁液を 840 ミクロンのナイロンメッシュを通して篩過し、実施例 18 のように、植物生長のために大きい細胞塊を除去する。840 ミクロン以下の懸濁液を沈澱させ、MS 液体培地中で 1 度洗浄し、そして MS 液体培地 2 ないし 5 ml 中に懸濁する。懸濁液 1 ないし 2 ml および新鮮 MS 液体培地 15 ml を含有するデロングフラスコ中の新鮮培地に移すことにより、懸濁液を副次培養する。7 ないし 10 日間隔でこの操作を繰り返すことにより培養体を維持する。各副次培養時、840 ミクロン以下の懸濁液のみを副次培養し、そして大きな塊 (840 ミクロンまたはそれより大きい) を植物生長のために用いる。

実施例 20 : 懸濁培養された細胞の大きい塊から植物体の産生

実施例 18 および 19 の懸濁生長操作を用い

の前にビベットにより上清を除去し、そして生成する細胞を以下に記載のように処理する。

2.1.2 アグロバクテリウムベクターに関する記述

アグロバクテリウム LBA 4434 株 [ヘケマ (Hoekema) 等、1983 年] は、Ti プラスミド誘導二元植物形質転換系を含有する。そのような二元系において、1 つのプラスミドは Ti プラスミドの T-DNA を含有し、第二のプラスミドは Ti プラスミドの vir-領域を含有し、そして 2 つのプラスミドは共に植物形質転換を起こすように機能する。アグロバクテリウム LBA 4434 株において、T-DNA プラスミド pAL 1050 は pTiAch 5 の T_L オクトピン Ti- プラスミドを含有する。LBA 4434 株内の vir プラスミド、pAL 4404 は pTiAch 5 の無傷の毒性領域を含有する (オームズ等、1982 年)。LBA 4434 株は、ネザーランド、ライデン大学、生化学学科のロバート シルペルロート (Robert Schilperoort) 博士から入手できる。

て 3 ないし 4 回の副次培養の後、T 型管およびデロングフラスコからの細胞懸濁液 1.5 ml ないし 2.0 ml を各々の場合において、2 mg/l NAA を含有するアガー固化 MS 培地、そして 500 mg/l カゼイン水解物を含有するビーズレイおよびティンダ培地にプレーティングする。3 ないし 4 週間以内に生長する胚を有する胚形成性カルスが見えるようになる。再び、840 ミクロンまたはそれより大きい細胞塊をカルス生長培地上にプレーティングし、生長する胚を有する胚形成性塊を生じ、結局植物体に生長する。

実施例 21 : アグロバクテリア LBA 4434 によるワタ懸濁培養細胞の懸濁表現型への形質転換

2.1.1 植物懸濁培養物の増殖

Acala ワタ懸濁培養液 [上記実施例 18 に記載] を、7 ないし 10 日毎に変えて、培地 (2 mg/l NAA 含有 MS 培地) を有する T 型管内に副次培養する。培地変換の後、T 型管を 90° に回転させ、そして細胞を沈澱させる。形質転換

2.1.3 アグロバクテリアの生長

形質転換するアグロバクテリウム株をグリセロール貯蔵液から取り出し、少量の一晚培養液中に接種し、それから培養液 50 ml を次の日接種する。アグロバクテリアを、適するよう抗生物質を添加した YEB 培地上で生長させる (YEB は水中に 1 l 当たり：牛肉抽出物 5 g、酵母抽出物 1 g、ペプトン 5 g、シロ糖 5 g を含む、NaOH で pH 7.2 に調整したものである。加圧滅菌後、2 M MgCl₂ 1 ml を添加する)。

50 ml の一晚培養液の 600 nm での吸光度 (OD₆₀₀) を読みとり、培養液を遠心分離し、そしてペレットを植物細胞生長培地 (NAA を 2 mg/ml で添加した MS 培地) 中に再懸濁し、600 nm で 0.5 の最終吸光度とする。この細胞懸濁液 8 ml を、上記 2.1.1 からの植物細胞を含有する各 T 型管に添加する。

2.1.4 感 染

植物および細胞培養液を含有する T 型管をかき混ぜて全細胞を再懸濁し、そして回転ドラムに

のワタ懸濁培養細胞の形質転換

3時間戻し、アグロバクテリアを植物細胞に付着させる。次いで細胞を沈澱させ、そして残りの上清を除去する。生長培地の新鮮な一部をT型管に添加し、そしてこれを回転ドラム上で18ないし20時間、留まっている残渣アグロバクテリアの存在下で培養する。この時間の後、細胞を再び沈澱させ、上清を除去し、そしてセフトキシム(200 µg/ml)を含有する生長培地溶液で2度細胞を洗浄する。洗浄後、各T型管からの細胞を、セフトキシム(全ての場合において200 µg/ml)を含有する生長培地10 mlに再懸濁し、そしてこの一部1 mlをベトリ皿上にプレティングする。

2.1.5. 形質転換された組織の生長

アグロバクテリアに感染した細胞は、植物ホルモンを添加しなかった生長培地上で生長し、その組織はT-DNA内の野生型植物ホルモン遺伝子を受けとったことを示す。これらの細胞は腫瘍に生長し、さらに培養体の形質転換も示す。
実施例22: カナマイシン耐性非腫瘍表現型へ

ールト博士から入手される。

2.2.3. アグロバクテリアの生長

pCIB10を含有するアグロバクテリアを、カナマイシン含有YEB上で生長させる。他の点では実施21の2.1.3と同様である。

2.2.4. 感染

2.1.3において生成する一部1 mlを選択的抗生物質含有培地上に即座にプレティングする以外は、実施例21において記載したように形質転換を行なう。選択培地はカナマイシン(50 µg/ml)またはG418(25 µg/ml)のいずれかを含有する。形質転換された植物組織内のnos/neo/nosキメラ遺伝子の発現は、これらの抗生物質のいずれかの上での、この組織の選択を可能にする。

2.2.5. 形質転換された組織の生長

本実施例および全ての以下の実施例における植物生長培地は、実施例15に示した植物ホルモンを含有する。

2ないし4週で、形質転換された組織は選択

形質転換する異なるアグロバクテリアを使用し、そして植物選択培地が形質転換された植物組織の選択のための抗生物質を含有することを除いて、実施例21と同じ操作を行なう。

2.2.1. 植物組織の生長

実施例21の2.1.1と同様。

2.2.2. アグロバクテリウムベクターに関する記述

形質転換するアグロバクテリアは、二元ベクターpCIB10(ロススタイン等、1987年)を含有するT-DNA並びにpAL4404 virプラスミドを含有する。pCIB10のT-DNAは、ノバリンシンターゼからのプロモーター、Tn5からのコード領域[酪氨酸オオマイシンホストランスフェラーゼをコードする]、およびノバリンシンターゼからのターミネーターからなるキメラ遺伝子を含有する。アグロバクテリウムLBA4404株は、virヘルパープラスミドpAL4404(上記)を含有し、同様にシルベル

プレート上に現われる。未感染組織または対照組織は生長の徴候を示さず、褐色に変わり、そして死ぬ。形質転換された組織はカナマイシンまたはG418の存在下で非常によく生長する。この時点で、十分に生長している組織片を新鮮な選択培地に副次培養する。

2.2.6. 体細胞胚の生長

体細胞胚はこれらの組織片上に生じる。体細胞胚を新鮮培地(非選択的)に移植する。

2.2.7. 発芽

胚が分化し、そして発芽し始めた時、即ち、それらが根を形成し始め、そして2または3枚の葉を有した時点で、それらを生長培地含有マゼンタボックスに移す。小植物体が6ないし8枚の葉を有するまで生長を続けさせ、その時点で、アガー培地から除去する。

2.2.8. 小植物体の生長

小植物体を今鉢内土壌に置き、ビーカーをかぶせ高湿度に保ち、そしてパーシバルインキューベーター内に4ないし8週間設置する。この時

点で、ピーカーを除去し、そして植物体を温室に移す。

2.2.9 温室内での植物体の生長

植物体は温室内で開花し、そして種子を形成する。

実施例 23 : グリホセート耐性表現型へのワタ

懸濁培養細胞の形質転換

以下に記載する変更を除いて、実施例 22 の操作を繰り返す。形質転換する異なるアグロバクテリアを用いる。また、形質転換された材料の選択のための抗生物質で植物組織を選択した後、それをさらに除草剤耐性に対して選択される。

2.3.1 植物組織の生長

実施例 21 の 2.1.1 と同様に行う。

2.3.2 アグロバクテリウムベクターに関する記載

形質転換するアグロバクテリアは、T-DNA ベクター pPMG 85/587 [フィラッチ(Fillatti)等、1987年]並びに pAL 4404 *vir* プラス

有する。形質転換された植物組織内の NPT キメラ遺伝子の発現は、これらの抗生物質のいずれかの上でのこの組織の選択を可能にする。

2.3.5 形質転換された組織の生長

2 ないし 4 週で形質転換された組織が選択プレート上に現われる。植物材料はカナマイシン上で最初に選択される。

植物組織〔個々の胚またはカルスのいずれか〕を次に除草剤グリホセートを含有する培地上に置く。形質転換された組織は十分に生長し続ける。

実施例 24 : ハイグロマイシン耐性非懸濁表現型へのワタ懸濁培養細胞の形質転換

以下に記載する変更を除いて、実施例 22 の操作を繰り返す。形質転換する異なるアグロバクテリアを用い、そして植物選択培地は形質転換された植物組織の選択のために適当な抗生物質を含有する。

2.4.1 植物組織の生長

ミドを含有する。プラスミド pPMG 85/587 は、植物に発現し得る 3 つのキメラ遺伝子を有する。これら遺伝子のうち 2 つは、抗生物質カナマイシンまたは G 418 に対する耐性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT) をコードする。第三のキメラ遺伝子はサルモネラチフィウム (*Salmonella typhimurium*) の突然変異 *aroA* 遺伝子からのコード配列を含有し、除草剤グリホセートに対する耐性を与える (コマイ等、1983 年)。

2.3.3 アグロバクテリアの生長

pPMG 85/587 を含有するアグロバクテリアを、カナマイシン含有 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 上で生長させる。

2.3.4 感染

2.1.3 において生成する一部 1 ml を選択的抗生物質含有培地上に即座にプレーティングする以外は、実施例 21 に記載したように形質転換を行なう。選択培地はカナマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または G 418 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のいずれかを含

実施例 21 の 2.1.1 と同様に行う。

2.4.2 アグロバクテリウムに関する記載

形質転換するアグロバクテリアは、二元ベクター pCIB 2115 (ロススタイン等、1987 年) を含有する T-DNA 並びに *vir* プラスミドを含有する。pCIB 2115 の T-DNA は、CaMV 35 転写からのプロモーターおよびターミネーター [オデル (Odell) 等、1985 年]、並びにハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼのコード配列 [グリッおよびデービス (Gritz and Davies)、1983 年] からなるキメラ遺伝子を含有する。

2.4.3 アグロバクテリアの生長

pCIB 2115 を含有するアグロバクテリアを、カナマイシン含有 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) YEB 上で生長させる。

2.4.4 感染

2.1.3 において生成する一部 1 ml を選択的抗生物質含有培地上に即座にプレーティングする以外は、実施例 21 に記載したように形質転換

を行う選択培地は50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有する。形質転換された植物組織内のハイグロマイシンキメラ遺伝子の発現は、ハイグロマイシンを含有する培地上でこの組織の選択を可能にする。

2.4.5 形質転換された組織の生長

抗生物質ハイグロマイシンを植物選択生長培地に用いる以外は、実施例22の2.2.5と同様に行なう。

実施例25：植物抽出操作

植物組織を抽出緩衝液中ホモジナイズする〔抽出緩衝液0.1 ml 中約100 mg〕。

葉抽出緩衝液

Na_2CO_3 (pH 9.5)	50 mM
EDTA	10 mM
トライトンX-100	0.05 %
ツイーン	0.05 %
NaCl	1000 mM
PMSF (使用直前に添加)	1 mM
ロイペプテン (使用直前に添加)	1 mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.976 g/4 l

140 mM NaCl NaCl 327 g/4 l

pH は約 7.4 とすべきである。

ホウ酸緩衝液

100 mM 硼酸
25 mM ホウ酸ナトリウム
75 mM NaCl

必要に応じて HCl または NaOH で pH を 8.5 に調整する。

エリザ阻止緩衝液

EPBS 中、
1 % BSA
0.02 % Na アジド

エリザ洗浄緩衝液

10 mM トリス-HCl pH 8.0
0.05 % ツイーン 20
0.02 % Na アジド

2.5 M トリス

エリザ希釈液

EPBS 中：

抽出後、2 M トリス pH 7.0 を添加して、抽出物の pH を 8.0 ないし 8.5 に調整する。抽出物を次にベックマンマイクロフュージ (Beckman microfuge) 中 10 分間遠心分離し、そして上清をエリザ (ELISA) 分析に使用する。

実施例26：植物組織のエリザ分析

エリザ〔酵素結合イムノソルベント測定法〕は、抗原物質に対する非常に鋭敏で特異的な測定法である。エリザはポリペプチド遺伝子産物の発現の研究に非常に有用である。エリザ技術の一般的手段としての発展はクラーク (Clark) 等 (1986 年) により記載されており、参照によりこれを本明細書内に挿入する。

Bt 毒素のためのエリザは標準法を用いて発展し、そして遺伝子導入植物材料の Bt 配列の発現を分析するために用いられる。本方法において用いられる工程を以下に示す。

培地および緩衝液

EPBS (エリザリン酸緩衝液)

10 mM リン酸ナトリウム Na_2HPO_4 4.68 g/4 l

0.05 % ツイーン 20

1 % BSA

0.02 % Na アジド

エリザ基質緩衝液

500 ml 中、
48 ml ジエタノールアミン、
24.5 mg MgCl_2 ;
HCl で pH 7.8 に調整する。

エリザ基質

基質緩衝液 25 ml 中の 15 mg p-ニトロフェニルホスフェート

操 作：

1. エリザプレートを経験済みで前処理する。
2. ホウ酸緩衝液中の 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の親和力精製ウサギ抗 Bt 毒素抗血清 (50 μl) をプレートに添加し、そしてこれを 4℃ で一晩培養する。ドデシル硫酸ナトリウムで可溶化した勾配精製 Bt 毒素結晶 (アングおよびニッカーソン (Ang and Nickerson), 1978 年) でのウサギの免疫反応に応じて、抗血清が製造さ

れる。

- 3 エリザ洗浄緩衝液で洗浄する。
- 4 阻止緩衝液と共に室温で1時間処理する。
- 5 エリザ洗浄緩衝液で洗浄する。
- 6 タンパク質 50 μ g を与えるような量で植物抽出物を添加する（これは典型的には抽出物約 5 μ l である）。葉抽出緩衝液は実施例 25 に記載されている；タンパク質をブラッドフォード（Bradford）法（ブラッドフォード、1976 年）により、市販のキット（カリフォルニア、リッチモンドのバイオラッド（Bio-Rad））を用いて定量化する。葉抽出物の希釈が必要である場合、エリザ希釈液を使用する。これを 4℃ で一晩培養する。
- 7 エリザ洗浄緩衝液で洗浄する。
- 8 エリザ希釈液中の 3 μ g タンパク質 / μ l の濃度の親和力精製ヤギ抗 Bt 毒素抗血清 50 μ l を添加する。
- 9 エリザ洗浄緩衝液で洗浄する。
- 10 アルカリホスファターゼに結合したウサギ

抗ヤギ抗体（ミズーリ、セントルイスのシグマケミカルズ（Sigma Chemicals）から市販されている）50 μ l を添加する。これを希釈液中に 1:500 に希釈する。37℃ で1時間培養する。

- 11 エリザ洗浄緩衝液で洗浄する。
- 12 基質（エリザ基質緩衝液中の 0.6 mg/ml p-ニトロフェニルホスフェート）50 μ l を添加する。室温で30分間培養する。
- 13 3 M NaOH 50 μ l を添加して反応を終結させる。
- 14 改良エリザ読み取り器（カリフォルニア、スタンフォードのヒューレット パッカード（Hewlett Packard））で 405 nm での吸光度を読み取る。

pCIB 10/35 Sbt (Bcl I) [第 16 図参照] 構築物で形質転換された植物組織は、エリザ操作を用いて測定した時陽性反応を示し、これは Bt 遺伝子の発現を意味している。

実施例 27 : 形質転換されたワタのバイオアッ

セイ

チーズクロスシート上に載せたヘリオスビレッセンス (*Heliothis virescens*) の卵を、ノースカロライナ、ラレイ、ノースカロライナ州立大学のタバコ昆虫防除研究所 (Tabacco Insect Control Laboratory) から入手する。このチーズクロスシートをカバー付きの大きなガラスビーカーに移し、そして湿ったペーパータオルで高湿度に保ち 29℃ で培養する。卵は 3 日以内にふ化する。ふ化後できるだけ早く、幼虫（カップ当たり幼虫 1 匹）をカバー付きの小さいプラスチックカップに移す。各カップはワタの葉の円形物を含む。幼虫を細かい剛毛の線毛でを用いて移す。

直径 1 cm の葉の円形物は、ワタ植物体の葉からパンチして取り出され、そして幼虫の入ったカップ内の湿った口紙の環の上に置く。幼若なそして古い両方の葉を代表して少なくとも 6 ないし 10 個の葉の円形物が各植物体から試験される。葉の円形物を 2 日間隔で、または幼虫に

餌食するのに必要なとき置き換える。形質転換された植物体の葉を餌食する幼虫の生長速度（大きさまたは全てのレプリカ幼虫の一体とした重量）および死虫率を、形質転換されていないワタの葉を餌食する幼虫のものとを比較する。

pCIB 10/35 Sbt (Bcl I) で形質転換されたワタの円形物を餌食する幼虫は、対照に比べ生長速度における減少および死虫率における増加を示す。

実施例 28 : 植物体に高程度に発現するための pCIB 1300 の製造

pCIB 1300 は Bt 毒素遺伝子の高程度の発現のために操作され、そして植物体内に Bt 毒素遺伝子発現を引き起こすための非翻訳先導配列 5' ないし Bt 毒素遺伝子を含む。非翻訳先導は、40 bp 配列 5' ないし Bt 毒素遺伝子の開始コドンおよび 3' ないし CaMV 35 S 非翻訳先導である。最終的な pCIB 1300 構築は、第 18 図に示すように pCIB 10/710 の Bam HI 部位内に 40 bp 先導および欠失 Bt 毒素遺伝子の挿入に

より操作される。pCIB10/35 Sbt (Bcl) 欠失からの 1.9 kbt Nco I-Bam HI 断片を、低温ゲル化アガロース中で精製する。40 bp 先端は、アプライド バイオシステムズ DNA シンセサイザーを用いて、5'突出 Bam HI 部位および 3'突出 Nco I 部位を有する二重鎖オリゴヌクレオチドとして化学的に合成される。第 18 図の中央部に示されるような非翻訳先端の配列は、コパーツバルソフ (Koper-Zwarthoff) 等 (1977 年) により記載されたアルファルファモザイクウイルス (AMV) コートタンパク質非翻訳先端から誘導される。40 bp 先端、1.9 kbp Bt 断片および Bam HI 線状化 pCIB710 ベクターは、T4 DNA リガーゼを用いて 3 ヶ所連結で結合されて、pCIB1300 が製造される。

実施例 29 : ワタ内の RuBPCase の小サブユニットをコードする cDNA クロンの分離

ゴッピンウム ヒルスタム (Funk 系 RF522) 植物体を、14 時間の日照時間で温室内種子か

ローンを求めて cDNA ライブラリーを次にスクリーニングする。cDNA クロンのニトロセルロース [シュライハーおよびシュエル (Schleicher and Schuell)] フィルターレプリカを、 α -dCTP および逆転写酵素で放射線標識した第一 cDNA 鎖でスクリーニングするが、鋳型は cDNA ライブラリー製造に用いたものと同じポリ A⁺RNA である。275 から 6 種の cDNA クロンが選択され、そしてさらに分析される。

ノーザン分析 (マニアチス等、1982 年、第 202 頁に記載のように行われる) は、これらの cDNA クロンのうち 2 種が長さ約 1100 nt のクラスとハイブリッド形成することを示す。それらはタバコからの Cab 遺伝子プローブとクロスハイブリッド形成する。その他の 4 種は長さ 900 ないし 1000 nt の mRNA のクラスとハイブリッド形成し、この大きさは rbcS [ルビスコ (Rubisco) の小サブユニット] のものに一致する。これらの 4 種の cDNA クロンの 1 つを用いてハイブリッド選択後、ワサギ網状赤血

から生長させる。ニューベリーおよびポッシングム (Newbury and Possingham) (1977 年) の方法に従って、全 RNA を幼若な緑葉から分離する。マニアチス等 (1982 年)、第 197 頁に記載されるようにポリ A⁺RNA を精製する。二重鎖 cDNA (相補的 DNA) を以下のようにオカヤマおよびバーグ (Okayama and Berg) (1982 年) の方法に従って合成する：

- A. 第一鎖 cDNA にオリゴ-dT を結合し、
- B. ポリヌクレオチドジルトランスフェラーゼを用いて二重鎖 cDNA の末端にオリゴ-dG を結合した後、それをオリゴ-dC を末端に有する pUC9 (Pst I 部位-ファルマシアから) 内にクローン化し、そしてアニーリングし；そして
- C. その DNA を大腸菌 HB 101 株内に形質転換する。

クロロフィル a/b 結合タンパク質 (Cab) と共に、RuBPCase は緑葉内に最も豊富にタンパク質であるから、最も豊富に mRNA の cDNA ク

球試験管内翻訳キット [プロメガ バイオテック (Promega Biotec)] を用いて、ワタの葉の mRNA を解離させ、そして試験管内で翻訳させる (マニアチス等、1982 年、第 329 頁に記載されたようにして)。翻訳産物のポリアクリルアミドゲル上での電気泳動は、その分子量が RuBPCase の前駆体に一致する約 20 kD の 1 つの主要なポリペプチドを示す。その他の 3 種の cDNA クロンの、ハイブリッド解離実験に用いたクローンとクロスハイブリッドする。

M13 内へのサブクローニングの後、ジデオキシ鎖終結法 [サンガー (Sanger) 等、1977 年] を用いて、これらの cDNA クロンの大部分を配列決定する。その他の種からのこれまで発表された rbcS 配列とそれらの配列との比較は、それらが確かに rbcS cDNA クロンであることを示す。

実施例 30 : ワタの小サブユニット RuBPCase のゲノムクロンの分離

30.1. ワタゲノムのサザン分析

ニトロセルロースフィルターを用いて標準法によりゲノムサザンプロットを調製する。プレハイブリッド化、ハイブリッド化および洗浄条件は、クレッシッヒ(Klessig)等(1983年)の記載と同様である。プローブとしてわれわれの *rbcS* cDNA クローンを用いたゲノムサザン分析は、DNAを消化するために用いられる制限酵素に応じて4ないし5種のゲノム断片を示す。RuBPCaseは、他の研究者により従来研究されたその他の種におけるように、ワタ内の小さい遺伝子ファミリーによりコード化されている。ワタ *rbcS* 複遺伝子ファミリーは、少なくとも5種のメンバーを含むと推定されている。

3.0.2 *rbc* ゲノムクロンの分離

ワタゲノムライブラリを製造するために、ワタゲノムDNAの部分的 *Sau3A* 消化物を10%ないし40%ショ糖勾配で大きさ分画し、そして *Bam* HI で消化した λ EMBL3 アーム(ストラタジーン(Stratagene))内に連結する。 λ 組換え体の封入をパッケージン ユット(Pa-

ckagene kit)(ストラタジーン)を用いて行い、続いて大腸菌 K802 株内にトランスフェクションさせる。プローブとして上記株からの *rbcS* cDNA クローンを用いて、マニアチス等(1982年)第320頁に記載のように、ニトロセルロースフィルター重複レプリカをスクリーニングする。450,000のブラークから12種の陽性クローンを精製する。マニアチス等(1982年)第80頁に記載されるように、これらの組換えファージのプレート溶解物からDNAを分離する。

種々の酵素でのそれらの制限消化パターンによるこれらのゲノムクロンを比較した後、5種の異なった *rbcS* 遺伝子が同定される。その各々をプラスミドベクター pBSM13⁺(ストラタジーン)内にサブクローン化する。遺伝子の5'末端および最初のATG(翻訳開始部位)を位置決めするために、次にこれらのサブクロンの遺伝子地図を作成し、そして部分的に配列決定する。これら5種のゲノムのサブクローン

のうちの2種 *rbc-gX* および *rbc-gY* の遺伝子地図を第23図に示す。サブクローン *rbc-gX* および *rbc-gY* のゲノムDNAを含有する λ EMBL3 ファージは、マリーランド、ロックビルの国際寄託機関アメリカン タイプ カルチャー コレクションに寄託されている。

3.0.3 ワタの葉内の *rbcS* 遺伝子断片の発現の

程度の研究

さらに41種の *rbcS* cDNA クローンをワタの葉のcDNAライブラリから分離する。遺伝子特異性プローブに対するこれらのcDNAクロンの制限マッピング分析、配列決定およびハイブリッド化は、ゲノムクローン *rbc-gX* の有する遺伝子は、ワタの葉の *rbcS* 転写が約17%関与していることを結論づける。

実施例31: ワタ *rbcS* プロモーターを用いた

カメラ遺伝子の製造

3.1.1 移送(transit)ペプチドをコードする

rbcS 遺伝子の最初のATGでの *Nco* I 部位の挿入

rbc-gX および *rbc-gY* の移送ペプチドの配列を以下に示す。

およびアミノ酸配列
rbc-gY移送ベプチドのヌクレオチド

CTACTAGCATGCTTCTCCTCAATGATCTCATCGGCTACCATGTCGCACTGCCTCTCCGGCA 60
GATCATGTTACCGACAGGATTTACTAGCTAGCGGATGTTAACGGTCACGGAGAGGGCGT
L L A H A S S M I S S A T I A T A S P A -
CAGCTTAACATGGTTCGCTCTTTTACCGGCTCAAGTCTGCCTCTGCTTTCCAGTCAAC 61
GTCCGATTGACACGCGAGGAATGCCCGGATTCAGACGGACACGAAGGGTCAGTAG
Q A N H V A P E T G L K S A S A F P V I -
ACGAGGCCAACACGACATTACTTCTTCGACAGCAATCGCGCAGAGTGCATGCG
TCCTCCGGTGTGTCGTAAATGAAGAGCGGTTCGTTACGCCGGTCTCAGCTTAGG 21
R K A N N D I T S L A S N G G R V Q C

およびアミノ酸配列
r b c - g X 移送バチドのヌクレオチド

1 A L G C A G T A T A A G C A T G C C C T C C T C A T G A T C T C A T C G G C A A C C A T T G C C A C C G T G A A C T 60
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T T C G T C A T T A T C G T T A C C G G A G G T A C T A G A G T A G C C G T T G G T A A C G G T G G C A C T T G A
 61 A V I A M A S S H I S S A T I A T V N C -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 G C T C T C C C C G C A C A G C C A C A T G T G C C C C C T T C A C C G G C C T C A A G T C T C C T C T G
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C G A G A G G G C C G T C C G G T T G T A C C A C C G G G G A G T G C C G G A G T T C A G C G G A G C 120
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 S S P A Q A N H V A P F T G L K S A S A -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C T T T C C A G T C A C T A G A G C C C A C A C A C A C A T C A C T T C T T C C A A G C A A T G G T G G A 180
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C A A A G G G T C A G T G A T C C T T C C G G T T G T G C T G A T G C A G A G A C A C T T C G T T A C C A C C T
 121
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 F P V T R K A N N D I T S L A S N G G R -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 G A G T G C A A T G C
 181
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C T C A C G T T A C G
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V Q C

上記配列において、最初の ATG および移送ペプチドのメチオニンを枠で囲って示している。

コードされる移送ペプチドのこれら2種の遺伝子の最初のATGに、Nco I 切断部位 (CCATGG) を導入する。これは、遺伝子 *rbc-gX* の Pst I - EcoRI 断片および遺伝子 *rbc-gY* の Xba I - Sph I 断片 (夫々第21および22図において斜線を付した断片) を夫々 mp18 および mp19 内にクローニングし、そして Nco I 部位を導入するためには上記の標準的なオリゴヌクレオチド特定部位の突然変異誘発方法を用いることにより行う。

3.1.2 rbc-gX 遺伝子プロモーターと共に欠失

B1 プロトキシシン遺伝子(607欠失)を
含有するキメラ遺伝子を有するプラスミ
ド、pCIB1301の製造

特定部位の突然変異誘発後、二重鎖複製型 (ds rf) DNA を M13 クローンから分離し、これを次に Hind III および EcoRI で消化する。

断片を、Hind III および EcoRI 消化プラスミド pUC 19 と一緒に連結し、そして連結混合物を次に大腸菌 HB 101 株内に形質転換される。プラスミド DNA をアンピシリンで選択された形質転換体から分離し、そして Hind III で消化する。生成した分子の末端を、DNA ポリメラーゼ I のクレノーサブユニットとの処理により blunt 末端とし、そして Sal I リンカーをこれらの末端に連結する。生成した線状分子を Sal I および Nco I で消化し、そしてゲル精製する。3 つの連結箇所において、アグロバクテリウム Ti プラスミドクローニングベクター（ロス・スティーン等、1982 年）として用いられた広い宿主範囲のレプリコン、pCIB 770 からのゲル精製 BamHI-Sal I 断片および切断された 607 アミノ酸 Bt 遺伝子を含有するゲル精製 Nco I - Bam HI 断片にゲル精製 Sal I - Nco I 断片を結合する。連結混合物を大腸菌 HB 101 株内に形質転換させる。第 19、20 および 21 図に示される、生成するプラスミド、pCIB1301

はカナマイシン上で選択される。

513 rbc-gY 遺伝子プロモーターと共に欠失
Bt プロトキシシン (607 欠失) を含有す
るキメラ遺伝子を有するプラスミド、
pCIB 1302 の製造

突然変異誘発後、二重鎖複製型 (ds rf) DNA を M13 クローンから分離し、これを次に Xba I-Nco I で消化する。欠失プロトキシシン遺伝子を含有する約 1.97 kbp Nco I-Bam HI 断片を次に、Xba I-Nco I rbc-gY プロモーター断片と共に、3ヶ所の連結部位で、Xba I-Bam HI 切断 pCIB 10/710 中に連結する。生成するプラスミド pCIB 1302 は、その構造が第 22 図に示され、カナマイシン上で選択される。

参考文献:

- An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P., Nester E.W., EMBO J. 4, 277, 1985
- Ang, B.J., Nickerson, K.W., Appl. Environ. Microbiol. 36, 625, 1978
- Barton, K.A., Chilton, M.-D., in: Wu, R., Grossmann, L., Moldave, K., Methods in Enzymology 101, 527, 1983
- Beasley, Ting, Am. J. Bot. 60, 130, 1973
- Bevan, M., Barnes, W.M., Chilton, M.-D., Nucl. Acids Res. 11, 369, 1983
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M.-D., Nature 304, 184, 1983
- Bevan, M., Nucl. Acids Res. 12, 8711, 1984
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Croza, J.H., Falkow, S., Gene 2, 95, 1977
- Bradford, M., Anal. Biochem. 72, 248, 1976
- Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inzé, D., van Haute, E., van Montagu, M., Schell, J., Zambryski, P., Science 222, 815, 1983
- Chaleff, R.S., Ray, T.B., Science 223, 1148, 1984
- Cheng et al., Plant Sci. Lett. 19, 91, 1980
- Chilton, M.-D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77, 7347, 1974
- Chilton, M.-D., Farrand, S.K., Levin, R., Nester, E.W., Genetics 83, 609, 1976
- Chilton, M.-D., Bevan, M.W., Yadav, N., Matzke, A.J.M., Byrne, M., Grula, M., Barton, K., Vanderleyden, J., de Fromond, A., Barnes, W.M., Stadler Genetics Symposia Series 13, 39, 1981
- Chilton, M.-D., in: the Role of Plant Biotechnology in Plant Breeding, Report of 1984 Plant Breeding Research Forum, 21.-23. August 1984, 177, 1985
- Clark M.F. et al., Methods in Enzymology 118, 742, 1986
- Comai, L., Schilling-Cordaro, C., Mergia, A., Houck, C.M., Plasmid 10, 21, 1983
- Covey, S.N., Lomonossoff, G.P., Hull, R., Nucl. Acids Res. 9, 6735, 1981
- Deacon, J.W., Aspects of Microbiology 7, ed. Cole et al., American Society of Microbiology, 1983
- DeBlock et al., EMBO Journal 3, 1681, 1984

- Miller, L.K., Lings, A.J., Bulla, L.A., *Science* 219, 715, 1983
- Morelli, G., Nagy, F., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Chua, N.H., *Nature* 315, 200, 1985
- Murashige, T., Skoog, F., *Physiol. Plant.* 15, 473, 1962
- Nagy, I.J., Maliga, P., *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 453, 1976
- Newbury, Possingham, *Plant Physiol.* 60, 543, 1977
- Norrander, J., Kempe, T., Messing, J., *Gene* 26, 101, 1983
- Odell et al., 1985
- Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M., *J. Mol. Biol.* 147, 217, 1981
- Okayama, Berg, *Mol. Cell. Biol.* 2, 161, 1982
- Ooms, G., Regensburg-Tuink, T.J.G., Hofker, M.H., Moekema, A., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., *Plant Molecular Biology* 1, 265, 1982
- Pastkowski, J., Shillito, R.D., Saul, M., Mandak, V., Hohn, T., Hohn, B., Potrykus, I., *EMBO J.* 3, 2717, 1984
- Rothstein, S.J., Lahners, K.N., Lotstein, R.J., Carozzi, N.B., Jayne, S.M., Rice, D.A., *Gene* 53, 153, 1987
- Sanger et al., 1977
- Sekar, V., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7036, 1987
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., in: Pühler, A. (Ed.), *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, Springer Verlag, Berlin, 98, 1983
- Velten, J., Velten, L., Main, R., Schell, J., *EMBO J.* 3, 2723, 1984
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., van Montagu, M., Zambryski, P., *Cell* 38, 455, 1984
- White, *Phytomorphology* 11, 19, 1961
- Wong, H.C., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R., *J. Biol. Chem.* 258, 1960, 1983
- Yadav, N.S., Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M., Chilton, M.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6322, 1982
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., *Gene* 33, 103, 1985
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M., Schell, J., *EMBO J.* 2, 2143, 1983
- Zoller, M.J., Smith, M., in: Wu, R., Grossmann, L., Moldave, K., *Methods in Enzymology* 100, 468, 1983
- van den Elzen, P.J.M., Townsend, J., Lee, K.Y., Bedbrook, J.R., *Plant. Mol. Biol.* 5, 299, 1985
- Fillard, J. et al., *Mol. Gen. Genet* 206, 192, 1987
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4803, 1983
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A., Flick, J.S., Fink, C.L., Hoffmann, N.L., Sanders, P.R., *Biotechnology* 3, 629, 1985
- de Fromond, A.J., Barton, K.A., Chilton, M.-D., *Biotechnology* 1, 262, 1983
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., *Exptl. Cell Res.* 50, 151, 1968
- Geiser, M., Schweitzer, S., Grimm, C., *Gene* 48, 109, 1986
- Gritz, L., Davies, J., *Gene* 25, 179, 1983
- Hernalsteens, J.P., van Vliet, F., de Beuckeleer, M., Depicker, A., Engler, G., Lemmela, M., Holsters, M., van Montagu, M., Schell, J., *Nature* 287, 654, 1980
- Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1929, 1978
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykas, P.J.J., Schilperoort, R.A., *Nature* 303, 179, 1983
- Hohn, T., Richards, K., Lebeurier, G., in: *Gene cloning in organisms other than E.coli. Current Topics in Microbiology and Immunology* 96, 193, 1982
- Holsters, M., de Vaele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., Schell, J., *Mol. Gen. Genet.* 163, 181, 1978
- Klausner, A., *Biotechnology* 2, 408, 1984
- Klee, H.J., Yanofsky, M.F., Mester, E.W., *Biotechnology* 3, 637, 1985
- Klessig et al., *Plant Mol. Biol. Reporter.* 1, 12, 1983
- Koper-Zwarthoff, E.C., Lockard, R.E., Alzner-DeWeerd, B., Rajshandary, U.L., Bol, J.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5504, 1977
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular cloning. a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982
- Matzke, A.J.M., Chilton, M.D., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 39, 1981
- Messing, J., in: Wu, R., Grossmann, L., Moldave, K., *Methods in Enzymology* 101, 20, 1983

4 図面の簡単な説明

第1図は、Btプロトキシン遺伝子の5'末端を含むプラスミド、mp19/btの製造工程図、

第2図は、Btプロトキシンコード配列の5'末端に融合したCaMV遺伝子プロモータを含むプラスミド、mp19/bt, ca/delの製造工程図、

第3図は、CaMV転写終結シグナルに融合したプロトキシンの5'コード領域を有するプラスミド、p702/btの製造工程図、

第4図は、CaMVプロモーターおよび終結配列を両端部に結合した完全なプロトキシンコード配列を含むpBR322/bt14の製造工程図、

第5図は、pRK252/Tn903/BglIIIの製造工程図、

第6図は、pCIB5の製造工程図、

第7および8図は、pCIB4の製造工程図、

第9図は、pCIB2の製造工程図、

第10図は、T-DNA境界および植物選択のための遺伝子を含む広い宿主範囲のプラスミド、

工程図、

第22図は、ワタrbs-gYプロモーター/Bt(607欠失)コード配列を含むキメラ遺伝子を有するpCIB1302の製造工程図、

第23図は、rbc-gXおよびrbc-gYを有するワタゲノムクローンの制限地図を示す図である。

特許出願人 テーガイギー アクチエンゲゼルシャフト

代理人 弁理士 専 隆 英
(ほか2名)

pCIB10の製造工程図、

第11図は、pCIB10/19Sbtの製造工程図、

第12図は、pCIB710の製造工程図、

第13図は、pCIB10/710の製造工程図、

第14図は、pCIB10/35Sbtの製造工程図、

第15図は、pCIB10/35Sbt(KpnI)の製造工程図、

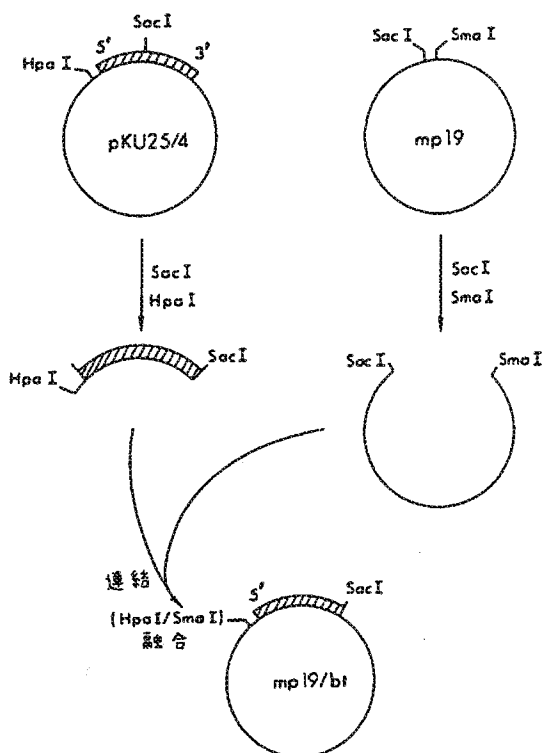
第16図は、pCIB10/35Sbt(BclI)の製造工程図、

第17図は、pCIB10/35Sbt(607)の製造工程図、

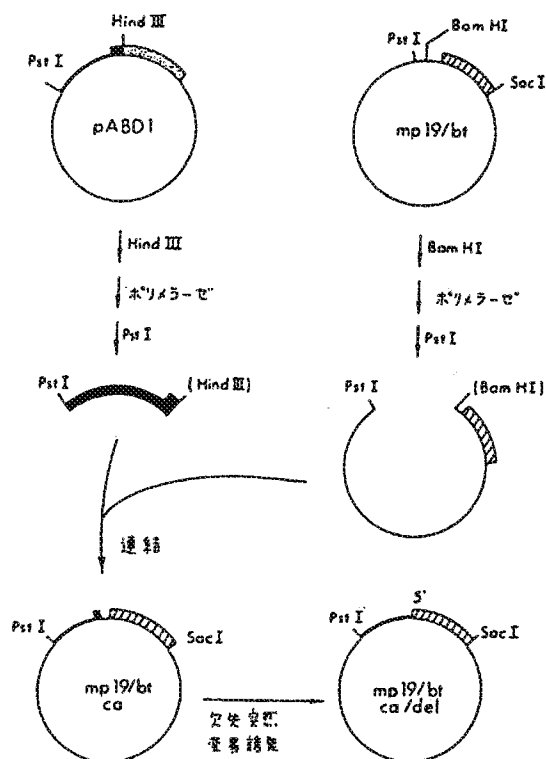
第18図は、CaMV35Sプロモーター/AMV先端/Bt(Bal)欠失/35Sターミネーターを含むキメラ遺伝子を有するプラスミドpCIB1300の製造工程図、

第19,20および21図は、ワタrbs-gXプロモーター/Bt(607欠失)コード配列を含むキメラ遺伝子を有するpCIB1301の製造工

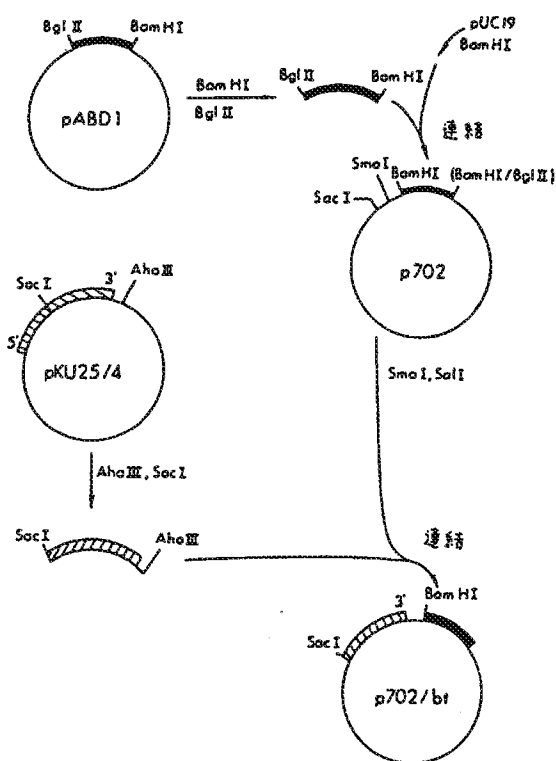
第1図



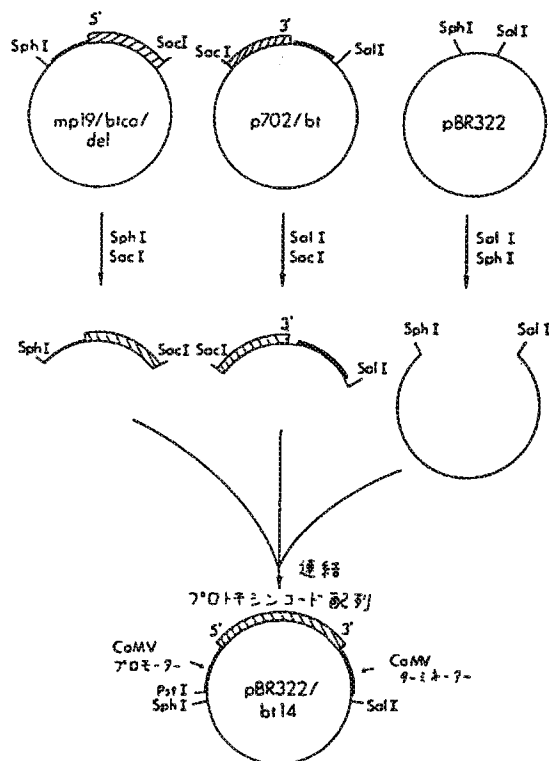
第 2 図



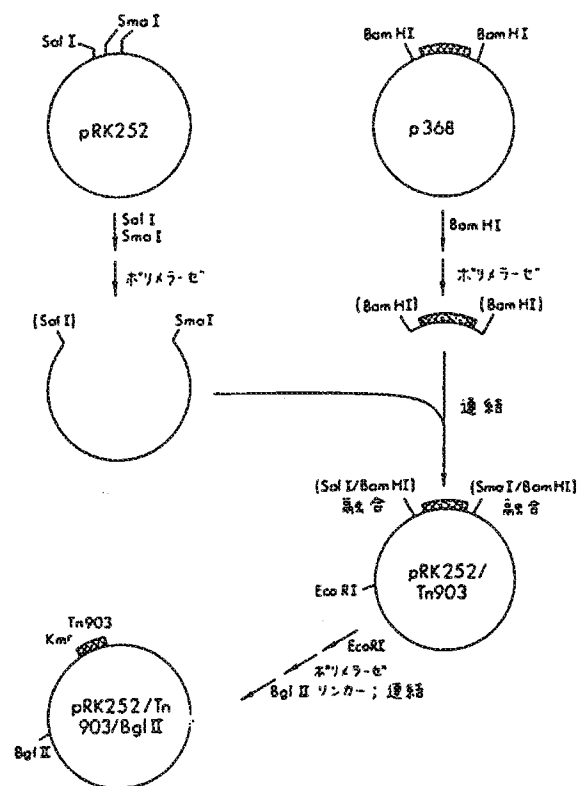
第 3 図



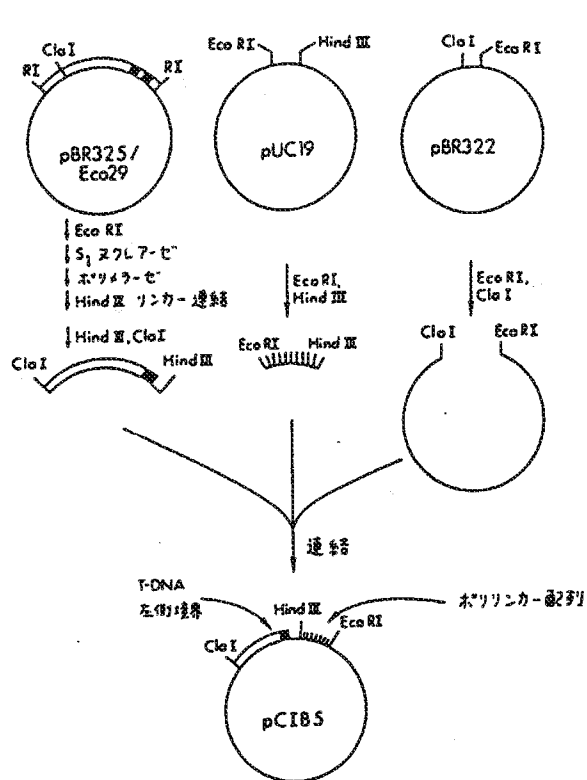
第 4 図



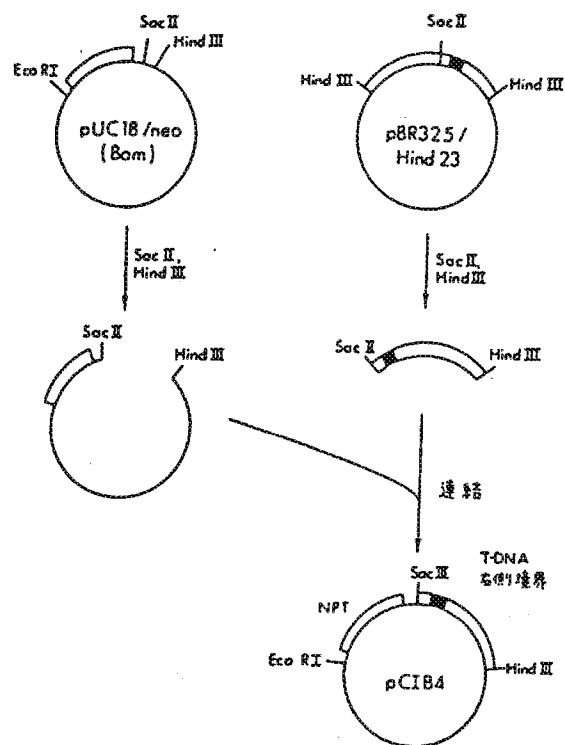
第 5 図



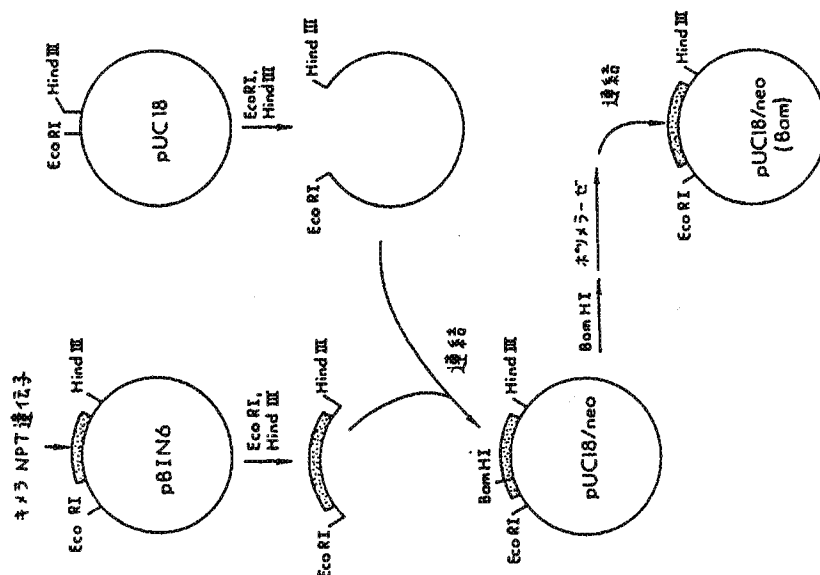
第 6 図



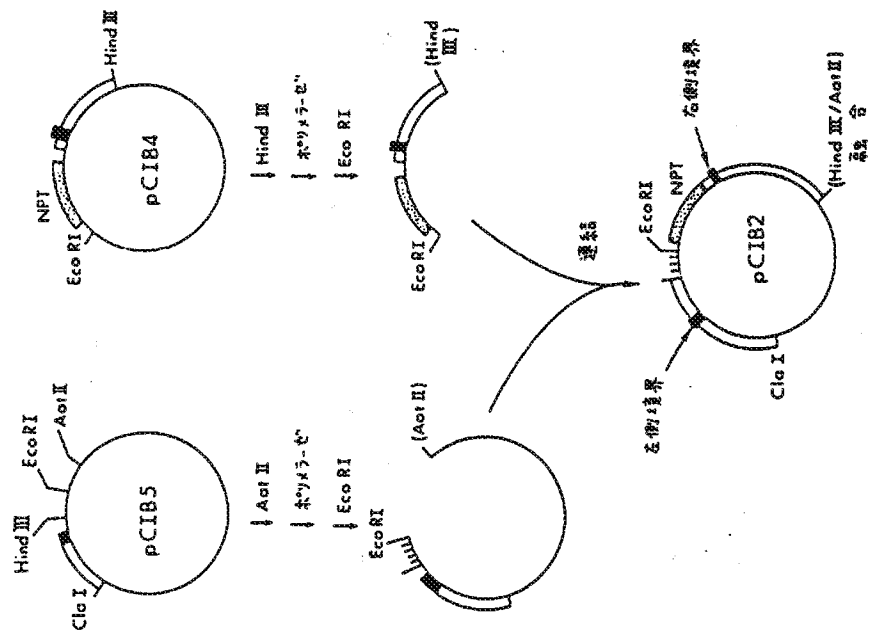
第 8 図



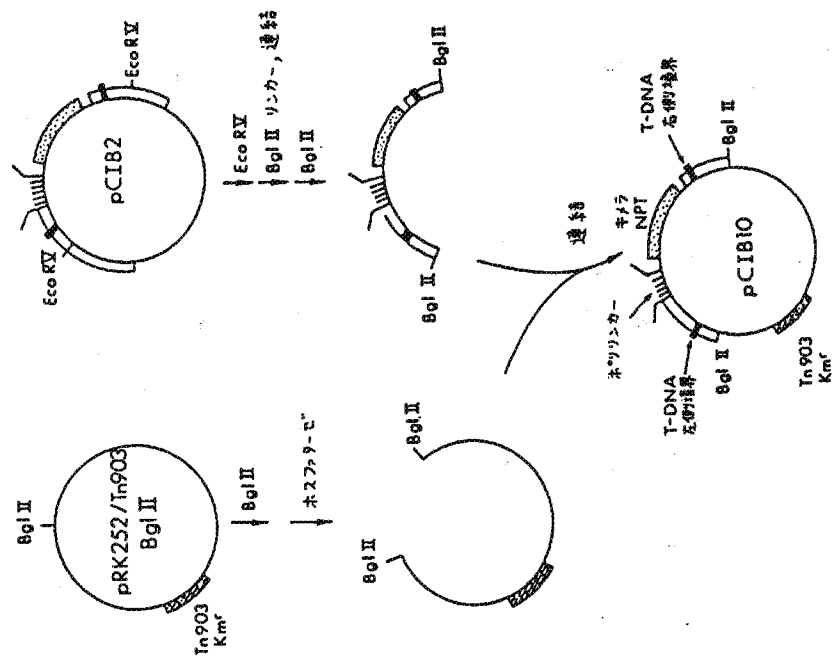
第 7 図



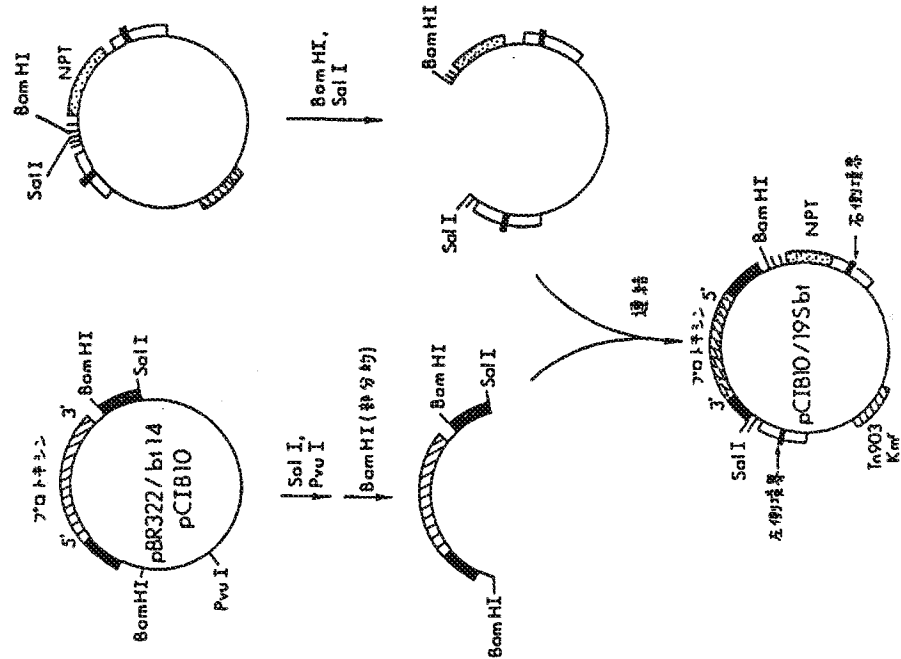
第 9 図



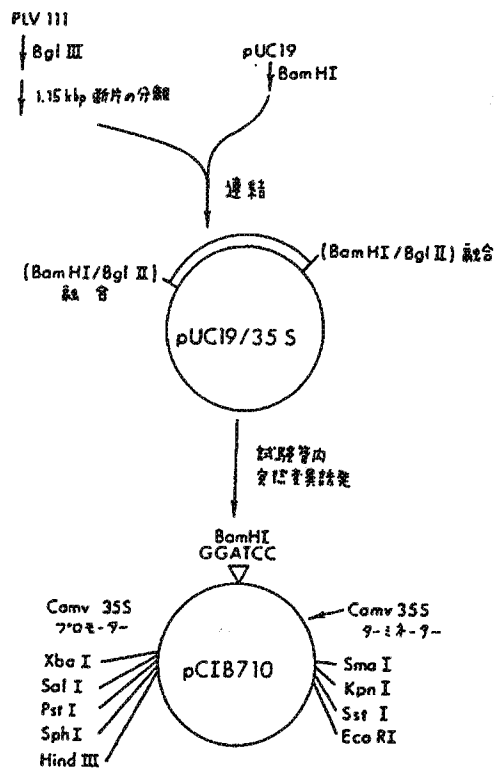
第 10 図



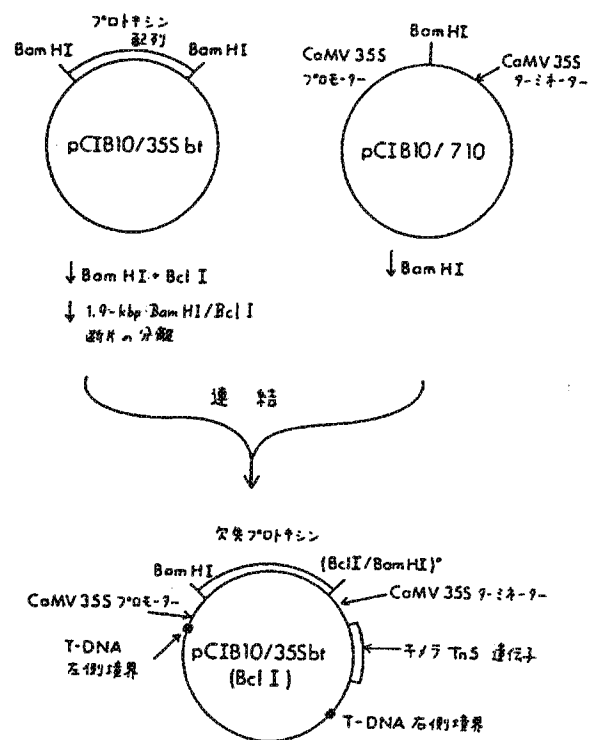
第 11 図



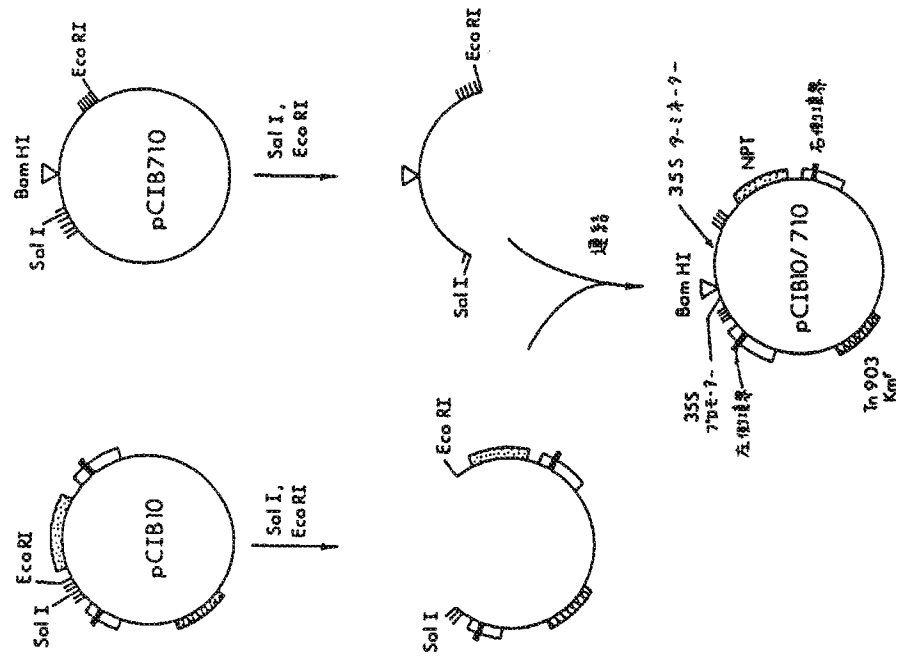
第 12 図



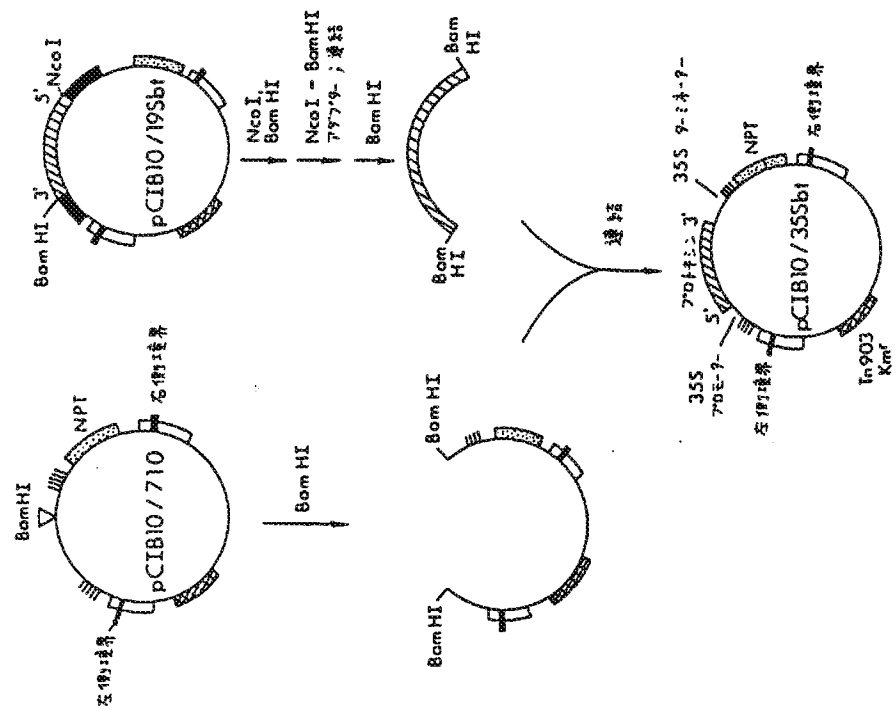
第 16 図



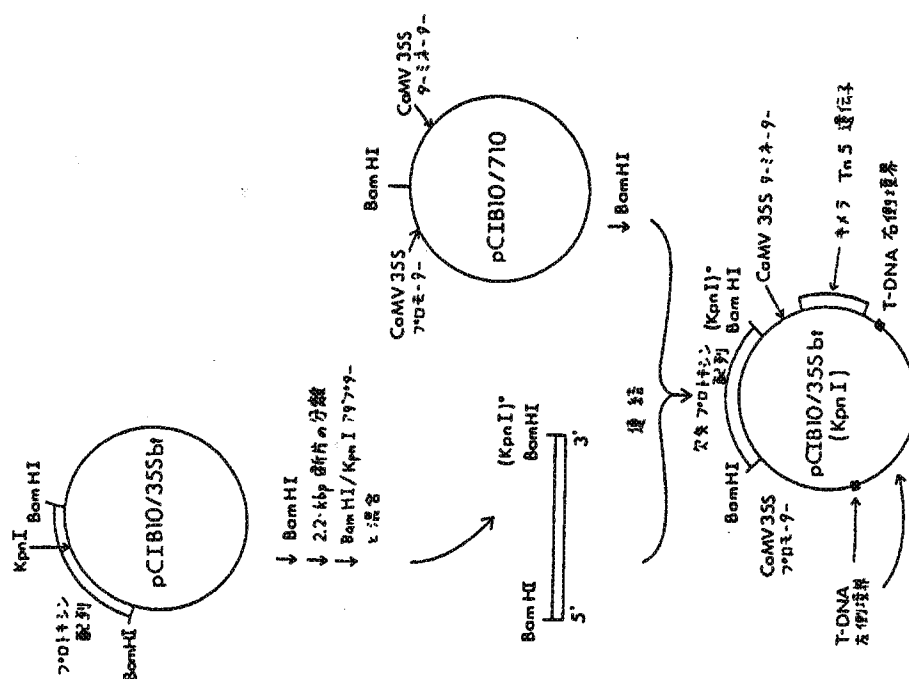
第 13 図



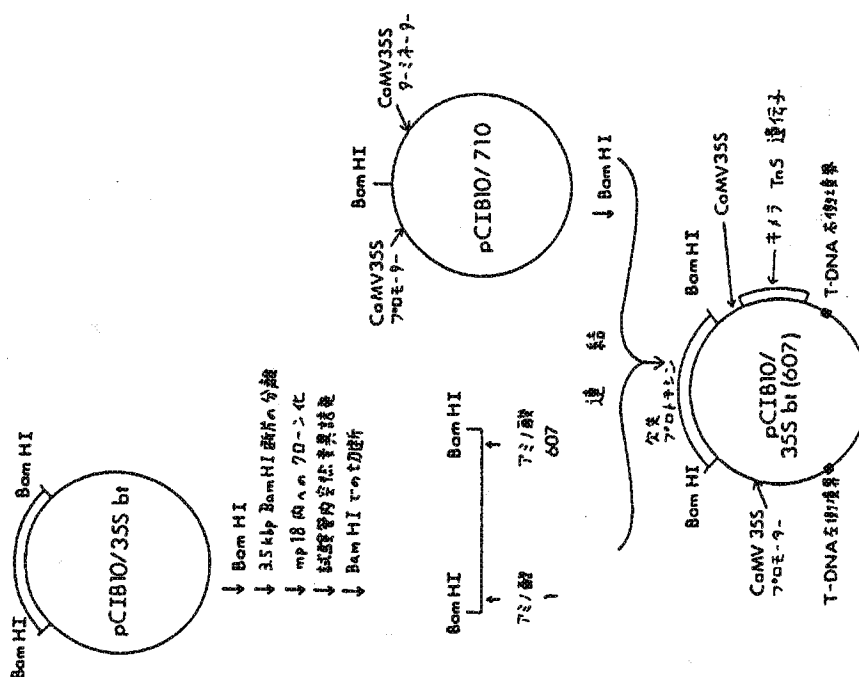
第 14 図



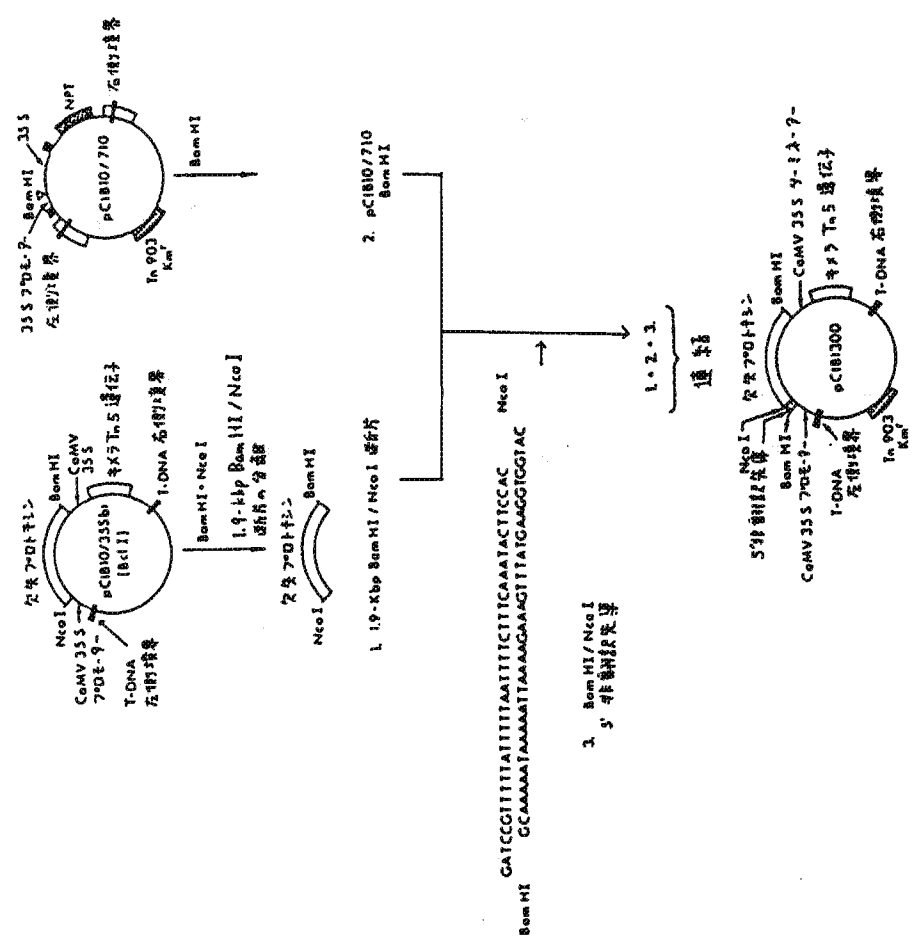
第 15 図



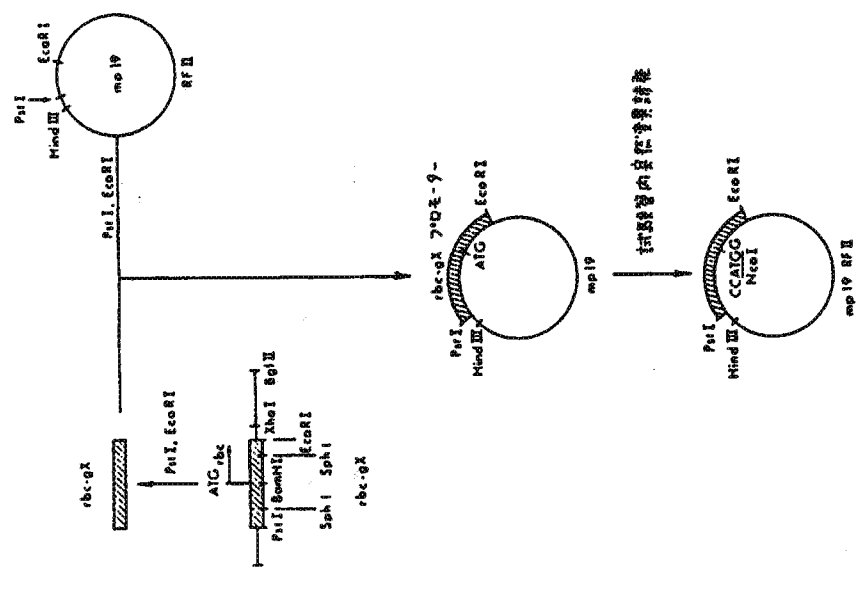
第 17 図



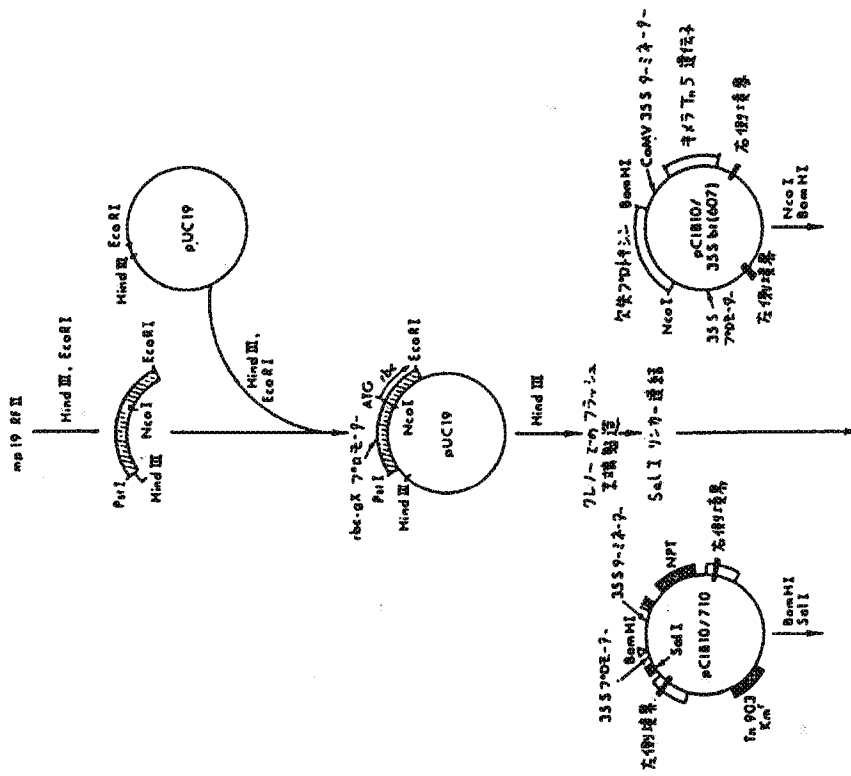
第 18 図



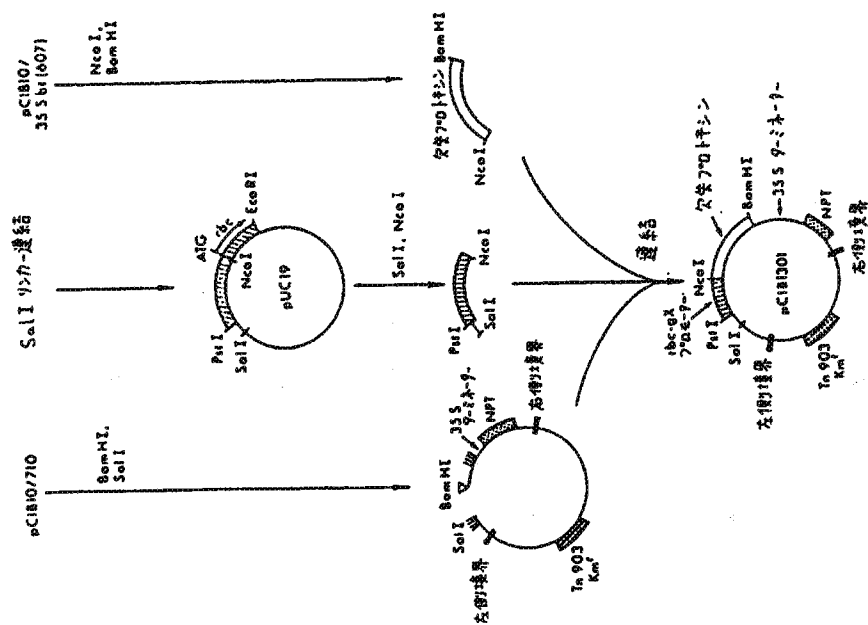
第 19 図



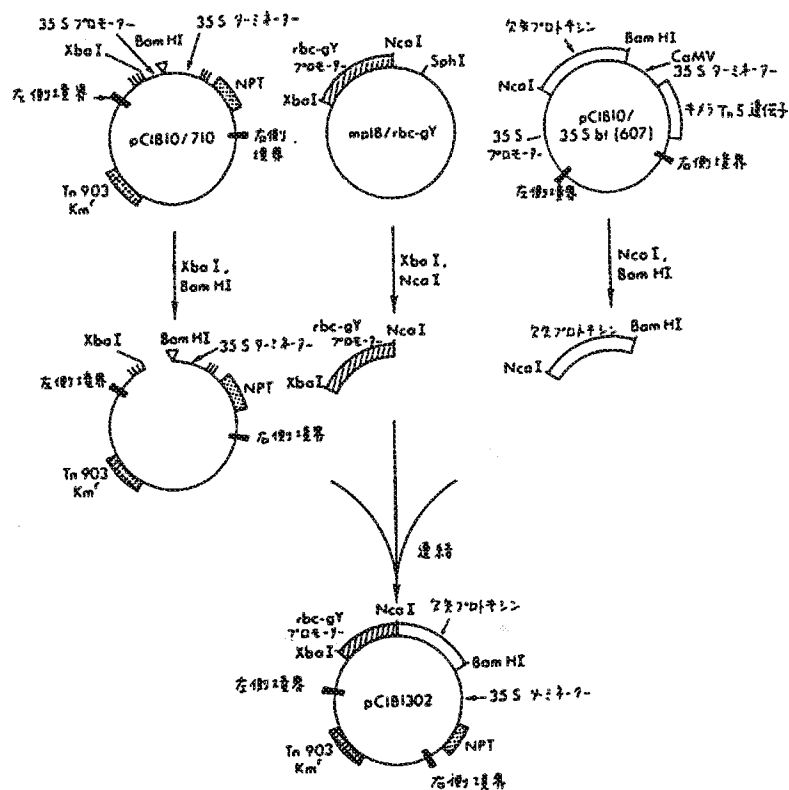
第 20 圖



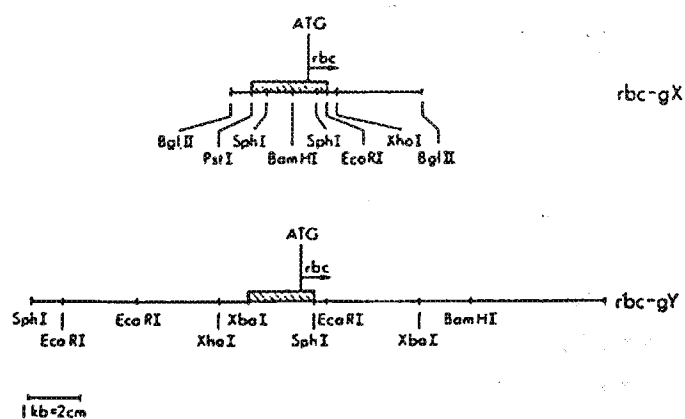
第 2 圖



第 22 図



第 23 図



第1頁の続き

- ⑦発明者 アニック デ フラモ アメリカ合衆国、ノースカロライナ 27705, 'ダーラム,
ンド ウェスト クラブ ブールバード 2422
- ⑧発明者 デービッド エム. ア アメリカ合衆国、カリフォルニア 91001, アルタデナ,
ンダーソン イー. スカイウツド サークル 1366
- ⑨発明者 カニーア ラジャセカ アメリカ合衆国、カリフォルニア 91024, シエラ マド
ラン ル, エスペランザ アベニュー 116 シー
- ⑩発明者 シルマール エス. ラ アメリカ合衆国、カリフォルニア 91107, パサデナ,
ンガン 2330 イー. デル マービー 1 201
- ⑪発明者 リチャード イエノフ アメリカ合衆国、カリフォルニア 91006, アルカディ
スキー ア, ダブリュ. ノーマン アベニュー 628

手続補正書

昭和63年12月16日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和63年特許願第292241号

2. 発明の名称

殺虫性ポリペプチドを発現するキメラ遺伝子を
含むワタ細胞

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 チバーガイギー アクチエンゲゼルシャフト

4. 代理人

住所 東京都千代田区神田駿河台1の6

お茶の水スクエアB館

氏名 (6271) 専 優美 (ほか2名)

5. 補正命令の日付

「 自発 」

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書第36頁下から第2行ないし第37

頁第1行の「プラスミド……14日)」を

「プラスミドpLW111……ATCC

40235

(寄託日: 1986年5月14日)」と補

正する。

